Aus der II. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin - Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

Die Wirkung von Seren bei Pure Red Cell Anemia und Osteomyelosklerose auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Paeschke
aus Berlin

1985

Aus der II. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin - Neukölln
Chefärztin: Prof. Dr. med. Irene Boll

Die Wirkung von Seren bei Pure Red Cell Anemia und Osteomyelosklerose auf menschliches Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Paeschke
aus Berlin

Referent: Frau Professor Dr. I. Boll

Korreferent: Herr Professor Dr. W. Siegert

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 26.11.1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	4
2. Fragestellung	6
3. Material und Methode	7
3.1. Material	7
3.2. Methode	12
3.3. Auswertung	13
3.4. Statistik	15
4. Ergebnisse	17
4.1. Zusatz von PRCA - Serum	17
4.2. Zusatz von OMS - Serum	44
5. Diskussion	71
5.1. Zusatz von PRCA - Serum	72
5.2. Zusatz von OMS - Serum	78
6. Zusammenfassung der Arbeit	81
7. Literaturverzeichnis	82

1. Einleitung

Im Jahre 1979 erschien in der Zeitschrift "Experimental Hematology" ein von I. BOLL veröffentlichter Artikel (9), bei dem die Einwirkung von Humanseren auf das menschliche granulozytäre System in Knochenmarkkulturen untersucht wurde. Hierbei wurde das Proliferations- und Reifungsverhalten normaler und pathologischer Knochenmarkzellen unter Zusatz verschiedener Patientenseren bearbeitet und beurteilt. Es wurden jedoch nicht alle haematologischen Systemerkrankungen erfaßt, so auch nicht die "Pure Red Cell Anemia" und die "Osteomyelosklerose".

Die "Pure Red Cell Anemia", auch "Pure Red Cell Aplasia" oder "Erythroblastopenie" genannt, war bereits häufig Gegenstand klinischer Studien und experimenteller Untersuchungen. Bei der "Pure Red Cell Anemia", die im folgenden nur noch mit der allgemein gebräuchlichen Abkürzung "PRCA" bezeichnet wird, stand die Erforschung pathogenetischer Mechanismen der Hemmung der Erythropoese unter Verwendung ferrokinetischer Parameter bei in vitro Experimenten und Tierversuchen im Vordergrund (1, 18, 27, 32, 34, 36, 40). In neuerer Zeit wurden Stammzelluntersuchungen unter Zusatz von Patientenserum oder gereinigten Antikörpern durchgeführt (35, 38, 39). Außerdem gelang der Nachweis dieser Antikörper an Kern- und Zytoplasmamembranen von Erythroblasten mittels Goldmarkierung (49).

Klinische Studien zielten auf die Entwicklung wirkungsvoller Behandlungsstrategien ab, wobei operative (Thymektomie, Splenektomie) und konservative Methoden (Anti - Lymphozyten - Globulin, Anti - Thymus - Globulin, Corticosteroide, Cytostatika) Gegenstand wissenschaftlicher Erörterungen sind (23, 33, 35, 40, 51, 58). Ferner wurde die pathogenetische Rolle des Thymus bzw. seiner neoplastischen Entartung und seine Bedeutung für die Behandlung wissenschaftlich bearbeitet (35, 48, 51). Beziehungen zur chronischen lymphatischen Leukämie (39)

konnten ebenso gezeigt werden wie einzelne Fälle von PRCA mit Philadelphia - Chromosom (54) bzw. mit Übergang in eine chronische myeloische Leukämie (50).

Kaum untersucht ist jedoch der Einfluß des Serums mit den Antikörpern solcher Patienten auf die gesamte Erythropoese. Die Granulopoese scheint bislang auch nicht betrachtet worden zu sein.

Die "Osteomyelosklerose", im folgenden nur noch als "OMS" bezeichnet, gehört zu den myeloproliferativen Erkrankungen. Sie war ebenfalls Ziel umfangreicher Untersuchungen. Hierzu gehörten biochemische und histologische Analysen des Kollagens sowie die Erforschung des Eisenstoffwechsels. Anhand ferrokinetischer Parameter wurde versucht, Stadieneinteilungen vorzunehmen (44, 45) sowie Erkenntnisse über die Erythrozytenkinetik und die Erythropoese zu gewinnen (21, 24, 30, 52, 53). Durch embryologische und phylogenetische Untersuchungen über die Entwicklung des haematopoetischen Systems sowie mittels Diagnostik chromosomaler Anomalien sollten möglichst frühe pathogenetische Mechanismen erfaßt werden (4, 13, 42, 46). Mittels Röntgenstrahlung und chemischer Substanzen ausgelöste Osteomyelofibrosen und -sklerosen an Mäusen wurden Erkenntnisse über das Verhalten von haematopoetischen und Stromazellen gewonnen (25). Das Einwandern haematopoetischer Zellen in die freie Markhöhle wurde ebenfalls tierexperimentell untersucht (19, 55). Unter Verwendung unreifer granulopoetischer Zellen aus dem Blut von OMS - Patienten konnten Diffusionskammerexperimente (15, 16, 47) und Stammzelluntersuchungen (14, 22, 31) erfolgreich durchgeführt werden.

Untersuchungen am menschlichen Knochenmark sind aufgrund der Verarmung an erythropoetischen und granulopoetischen Zellen bei der OMS schwierig und in der Literatur nur in Einzelfällen beschrieben (56, 57).

2. Fragestellung

In vitro Untersuchungen am menschlichen Knochenmark ermöglichen, durch kontrollierte Bedingungen die Größe der Variationsbreite der Ergebnisse zu verringern. Der Vorteil solcher Experimente liegt ferner darin, reaktive humorale und nervale Einflüsse, wie sie bei in vivo Untersuchungen unvermeidlich auftreten, zu umgehen. Die Frage der Relevanz für den menschlichen Organismus, die bei Tierversuchen eine nicht unerhebliche Rolle spielt, ist bei diesen Untersuchungen von geringer Bedeutung.

In Anlehnung an die Fragestellung der eingangs erwähnten Arbeit von I. BOLL wird nun hier die Wirkung der Seren von je einem Patienten mit "Pure Red Cell Anemia" (PRCA) und "Osteomyelosklerose" auf normale menschliche Knochenmarkkulturen untersucht. Bei der PRCA handelt es sich um eine chronische Erythroblastopenie des Erwachsenenalters. Durch vergleichende Zellzählungen von Kulturen mit und ohne Serumzusatz von Patienten der beiden genannten Erkrankungen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) Welche Veränderungen ergeben sich im Reifungsverhalten des erythrozytären und granulozytären Systems unter Zusatz der genannten Seren ?

2) Ändert sich das quantitative Verhältnis von granulopoetischen zu erythropoetischen Zellen (G/E - Index) ?

3) Welche Unterschiede lassen sich bezüglich des Erythroblasten - und Granuloblasten - Mitose - Index und der Mitosephasenverteilung unter Serumzusatz erkennen ?

4) Zeigen sich morphologische Veränderungen ?

3. Material und Methode

3.1. Material

Zur Durchführung der Experimente wurde das Knochenmark von vier Spendern benutzt, deren Knochenmarkbefunde lediglich geringe reaktive Veränderungen aufweisen und deshalb als "normal" angesehen werden können. Einige klinische Daten der Patienten sollen im folgenden aufgeführt werden.

3.1.1. Versuch 1

Patientin:	M., Ursula, 49 Jahre, ambulant	
Diagnose:	Eisenmangelanämie im Abklingen	
Sternalpunktion vom 8.1.79:	gesteigerte Granulopoese, leicht verminderte Erythropoese, fast normale Eisenspeicherung im Retikulum	
Blutbild vom 8.1.79:	Erythrozyten	3,9 Mill./mm^3
	Hb	11,9 g%
	Hb_E	29,7 pg
	Thrombozyten	218000/mm^3
	Leukozyten	6600/mm^3
	Segmentkernige	57 %
	Stabkernige	1 %
	Eosinophile	4 %
	Lymphozyten	35 %
	Monozyten	3 %
Medikation:	Praxiten forte^R	1 Tabl./d
	Kobalt - Ferlecit^R i.v.	

3.1.2. Versuch 2

Patient:	Sch., Willi, 57 Jahre, stationär	
Diagnose:	Leberzirrhose mit Zeichen portaler Hypertension, insulinpflichtiger Diabetes mellitus, Myokardinsuffizienz	
Sternalpunktion vom 3.5.79:	Befund wie bei Eisenmangelanämie, Erythropoese und Granulopoese linksverschoben	
Blutbild vom 30.4.79:	Erythrozyten	3,38 Mill./mm^3
	Hb	7,20 g%
	Hb_E	21,10 pg
	Thrombozyten	188000/mm^3
	Leukozyten	5900/mm^3
	Segmentkernige	65 %
	Stabkernige	1 %
	Eosinophile	4 %
	Basophile	1 %
	Lymphozyten	19 %
	Monozyten	10 %
Medikation:	Ce - Ferro forte^R	1 Kapsel/d
	Lanicor^R	2x1 Tabl./d
	Dytide H^R	1 Tabl./d
	Novo - Rapitard	morgens 40 IE, abends 24 IE/d

3.1.3. Versuch 3

Patientin:	N., Hildegard, 55 Jahre, stationär
Diagnose:	Teils solide, teils drüsig wachsendes Bronchialcarcinom im linken Lungenunterfeld, Verdacht auf Magen - Frühcarci Verdacht auf Six - sinus - Syndrom, Recht herzinsuffizienz

Sternalpunktion		
vom 28.2.79:	geringe Eosinophilie, mäßige Plasmazellvermehrung, sonst Befund wie bei Eisenmangelanämie	
Blutbild		
vom 28.2.79:	Erythrozyten	3,33 Mill./mm^3
	Hb	10,30 g%
	Hb_E	30,60 pg
	Thrombozyten	224000/mm^3
	Leukozyten	7300/mm^3
	Segmentkernige	69 %
	Stabkernige	6 %
	Eosinophile	3 %
	Lymphozyten	16 %
	Monozyten	6 %
Medikation:	Chinidin Duriles^R	4x1 Tabl./d
	Bricanyl^R	2x1 Tabl./d
	Ce - Ferro forte^R	1 Kapsel/d
	Lanicor^R	2x1 Tabl./d

3.1.4. Versuch 4

Patientin:	L., Barbara, 26 Jahre, ambulant	
Diagnose:	fragliche Thrombopenie	
Sternalpunktion		
vom 27.1.79:	Normalbefund	
Blutbild		
vom 25.10.78:	Erythrozyten	4,42 Mill./mm^3
	Hb	13,50 g%
	Hb_E	30,90 pg
	Thrombozyten	349000/mm^3
	Leukozyten	10500/mm^3
	Segmentkernige	77 %
	Stabkernige	5 %
	Eosinophile	2 %
	Lymphozyten	11 %
	Monozyten	5 %

Zu den Knochenmarkzellen der Spender in den Versuchen 1 - sind die Seren folgender Patienten zugesetzt worden:

für die PRCA:

Patientin:	S., Gerda, 63 Jahre, stationär	
Diagnose:	isolierte Erythroblastopenie, Harnwegsinfekt	
Sternalpunktion vom 27.9.76:	relativ vermehrte, rechtsverschobene Granulopoese, normale Thrombopoese, normoblastische, aber nahezu aplastische Erythropoese	
Blutbild vom 28.9.76:	Erythrozyten	2,4 Mill./mm^3
	Hb	7,2 g%
	Hb_E	30,2 pg
	Thrombozyten	98000/mm^3
	Leukozyten	5700/mm^3
	Segmentkernige	60 %
	Stabkernige	6 %
	Eosinophile	2 %
	Basophile	1 %
	Lymphozyten	25 %
	Monozyten	6 %
Medikation:	Novodigal^R 0,2 mg	2x1 Tabl./d
	Ultracorten^R	50 mg/d
	Bactrim^R	2x1 Tabl./d

für die OMS:

Patient:	B., Heinz, 60 Jahre, stationär	
Diagnose:	Osteomyelosklerose	
Sternalpunktion vom 15.9.77:	außer einigen granulopoetischen Vorstufen nur Blut Histologie: Erythropoese und Granulopoese vermindert, Vermehrung von Histiozyten, Fibroblasten und Fibrozyten, Megakaryoblasten und Megakaryozyten; Dilatation der Kapillarsinus, kräftige Spongiosabälkchen ohne Anhalt für Knochenumbau	
Blutbild vom 15.9.77:	Erythrozyten	2,7 Mill./mm^3
	Hb	8,8 g%
	Hb_E	32,5 pg
	Thrombozyten	531000/mm^3
	Leukozyten	4200/mm^3
	Segmentkernige	37 %
	Stabkernige	20 %
	Eosinophile	7 %
	Lymphozyten	32 %
	Monozyten	2 %
	Myelozyten	2 %
Medikation:	Lanicor^R	2x1 Tabl./d
	Erythrozytensedimente	

3.2. Methode

Die Kulturansätze werden nach einer 1975 von I. BOLL entwickelten und leicht modifizierten Methode durchgeführt (8). Die Knochenmarkbröckel werden durch Sternal - oder Beckenkammpunktat steril gewonnen und in Hank's - Salzlösung (Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232, US aufgefangen. Die Lösung enthält Heparin, damit das im Punktat befindliche Blut nicht gerinnt. Anschließend erfolgt die Herstellung der Zellsuspension. Zunächst wird das Mark durch mehrere Kanülen abnehmenden Durchmessers gezogen und der Fettanteil verworfen. Die Zellsuspension wird mit Hilfe von RPMI - Flüssigkeitsmedium mit Glutamin (Gibco - Bio - Cult, 3 Washington Road, Paisley PA3 4EP, Scotland) hergestellt. Hierbei wird der Zellanteil auf ein Endkonzentration von 2000 Zellen/mm^3 eingestellt. Um die Veränderungen in den Kulturen mit Serumzusatz (40 % vom Gesamtansatz) beurteilen zu können, werden sie entsprechen Kulturen ohne Serumzusatz (Kontrolle) gegenübergestellt. Das Serum wurde bis zu seiner Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Es ergeben sich folgende Zusammensetzungen für Kontroll - und Zusatzkulturen:

Kontrolle: 1) 1,8 ml Zellsuspension in RPMI - Medium
2) 11,3 µg Ampicillin und
2,4 µg Streptomycin pro ml Suspension

Zusatzkultur: 1) und 2) wie oben
3) 0,4 ml/ml Patientenserum (PRCA bzw. OM
≙ 40 % vom Gesamtansatz

Der Gesamtansatz wird in mehrere Proben aufgeteilt und in sterile Einmalgefäße gefüllt, so daß zu jedem Kontrollzeitpunkt zwei Proben vorhanden sind. Die Gefäße werden luftdicht verschlossen. Nach Bebrütung im Wärmeschrank bei 37°C werden nach 24, 48 und 72 h mit Hilfe der Zytozentri bei 500 U/min (≙ 22·g) über fünf Minuten drei Ausstriche

Kultur und Kontrolltag angefertigt. Die Präparate werden nach Pappenheim gefärbt. Um Ausgangswerte zu Versuchsbeginn, also einen Null - Stundenwert, zu erhalten, werden entweder nach Einstellung der Zellkonzentration Ausstriche angefertigt oder Knochenmarkpräparate benutzt.

3.3. Auswertung

Zu jedem Kontrollzeitpunkt werden Differentialzählungen von ca. 1000 Zellen je Kontrollkultur (0, 24, 48, 72 h), von etwa 3000 Zellen je Zusatzkultur nach 24 h und ungefähr 2000 Zellen je Zusatzkultur nach 48 und 72 h durchgeführt. Insgesamt werden ca. 72000 Zellen differenziert. Unter Zuhilfenahme eines haematologischen Atlas (41) und von Zellbeschreibungen von I. BOLL (5, 11) werden folgende Zellarten unterschieden:

in der Erythropoese:

1)	Proerythroblasten	(PE)
2)	basophile Erythroblasten	(bE)
3)	polychromatische Erythroblasten	(pE)
4)	oxyphile Erythroblasten	(oE)
5)	reife Erythroblasten	(rE)

in der Granulopoese:

1)	Myeloblasten	(Mb)
2)	Promyelozyten	(Pm)
3)	neutrophile Myelozyten	(nM)
4)	eosinophile Myelozyten	(eM)
5)	basophile Myelozyten	(bM)
6)	Promonozyten	(PM)
7)	Metamyelozyten	(Mt)
8)	neutrophile stabkernige Granulozyten	(nstG)
9)	neutrophile segmentkernige Granulozyten	(nsegG)
10)	eosinophile segmentkernige Granulozyten	(eG)
11)	basophile segmentkernige Granulozyten	(bG)
12)	Monozyten	(Mo)

bei den übrigen Zellen:

Lymphozyten
Megakaryoblasten
Megakaryozyten
Plasmazellen
große Retikulumzellen (einschließlich phagozytierende)

Bei der Erythropoese gelten die Zellen 1 - 4, bei der Granulopoese die Zellen 1 - 7 als teilungsfähig.

Aus den gewonnenen Daten können folgende Parameter abgeleitet werden:

1) Reifungskurven: Sie zeigen die prozentuale Verteilung der differenzierten Zellen in Erythropoese und Granulopoese am jeweiligen Kulturtag. Die Werte werden in der graphischen Darstellung additiv aufgetragen.

2) G/E - Index: Er gibt das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese an.

3) Mitose - Index: Er ist definiert als Anteil in Teilung befindlicher Zellen auf 1000 teilungsfähige. Er wird für Erythropoese und Granulopoese getrennt ermittelt und in ‰ angegeben.

4) Karyologische Kurven: Sie geben die prozentuale Mitosephasenverteilung bezogen auf die Gesamtzahl der Mitosen wieder.

3.4. Statistik

Beim Vergleich von Kontroll- und Zusatzkultur werden die Unterschiede zwischen den Mitose - Indices sowie zwischen den Anteilen der einzelnen Zellarten mit dem χ^2- Verfahren nach H. PEARSON auf Signifikanz überprüft. Hierdurch soll das Maß der Übereinstimmung der miteinander verglichenen Werte untersucht werden. Folgende Formel wird verwendet:

$$\chi^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

B = Beobachtungswert
E = Erwartungswert

Der so errechnete χ^2- Wert wird unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades und unter Benutzung einer Kurventabelle (3) in einen Wahrscheinlichkeitswert (p) umgerechnet. Der Unterschied gilt dann als signifikant, wenn dieser Wert unterhalb einer willkürlich festgelegten Grenze liegt. In dieser Arbeit gilt:

$p > 0{,}05$: Der Unterschied zwischen beiden Werten ist zufallsbedingt.

$0{,}05 > p > 0{,}01$: Der Unterschied zwischen beiden Werten ist statistisch einigermaßen gesichert.

$p < 0{,}01$: Der Unterschied zwischen beiden Werten ist statistisch gut gesichert.

Rechenbeispiel:
In einer Kontrollkultur wurden 17 Mitosen auf 1349 teilungsfähige Zellen ermittelt. Die entsprechende Zusatzkultur zeigte 19 Mitosen auf 2980 teilungsfähige Zellen.

	B_M	B_N	B_{M+N}	E_M	E_N
Kontrolle	17	1332	1349	11,22	1337,78
Zusatzkultur	19	2961	2980	24,78	2955,22
Summe	36		4329		

B_M = Beobachtungswert der Mitosen
B_N = Beobachtungswert der Nicht - Mitosen
B_{M+N} = Beobachtungswert der teilungsfähigen Zellen
E_M = Erwartungswert der Mitosen
E_N = Erwartungswert der Nicht - Mitosen

Kontrolle: $E_M = \frac{36 \cdot 1349}{4329} = 11,22$ $E_N = 1349-11,22 = 133$

Zusatzkultur: $E_M = \frac{36 \cdot 2980}{4329} = 24,78$ $E_N = 2980- 24,78= 295$

Kontrolle: $B_M-E_M = 5,78$; $(B_M-E_M)^2= 33,41$; $\frac{(B_M-E_M)^2}{E_M} = 2$

$B_N-E_N = 5,78$; $(B_N-E_N)^2= 33,41$; $\frac{(B_N-E_N)^2}{E_N} = 0$

Zusatzkultur: $B_M-E_M = 5,78$; $(B_M-E_M)^2= 33,41$; $\frac{(B_M-E_M)^2}{E_M} = 1$

$B_N-E_N = 5,78$; $(B_N-E_N)^2= 33,41$; $\frac{(B_N-E_N)^2}{E_N} = 0$

$$\chi^2 = \sum \frac{(B-E)^2}{E} = 2,98 + 0,02 + 1,35 + 0,01 = 4,36$$

Für $\chi^2 = 4,36$ kann aus der erwähnten Tabelle ein Wahrscheinlichkeitswert p = 0,034 entnommen werden.
In dieser wie bei allen anderen Signifikanzberechnungen dieser Arbeit gilt ein Freiheitsgrad von eins.

4. Ergebnisse

Vor Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Versuche soll noch folgendes angemerkt werden: Die Zahlenwerte für Promonozyten fließen in die der Promyelozyten mit ein, die der basophilen Myelozyten in die der eosinophilen Myelozyten. Diese Zellarten zeigen jeweils ähnliche Veränderungen, doch ist ihr Anteil an der Gesamtzahl granulopoetischer Zellen für eine getrennte Betrachtung zu gering. Für Promonozyten wie für basophile Myelozyten gilt, daß ihr prozentualer Anteil meist deutlich unter 1 % liegt. Im folgenden ist nur noch von Promyelozyten und eosinophilen Myelozyten die Rede.

4.1. Zusatz von PRCA - Serum

4.1.1. Versuch 1: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 1)
Nach 24 h zeigt sich unter PRCA - Serumzusatz eine deutlich stärkere Verschiebung der Zellanteile zugunsten von oxyphilen und reifen Erythroblasten als bei der Kontrolle. Dieser Effekt schwächt sich bei 48 h ab und tritt nach 72 h wieder deutlich in Erscheinung.

Granulopoese (Abb. 2)
Durch PRCA - Serumzusatz erscheint die Granulopoese zu reifen Zellformen hin verschoben, wobei der Anteil der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten stärker zunimmt. Nach anfänglich deutlicher Abnahme steigt der Anteil der Promyelozyten bei 48 und 72 h wieder an.

G/E - Index (Tab. 1)
Der G/E - Index steigt sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Zusatzkulturen im Zeitverlauf an, bei letzteren jedoch stärker.

Abb. 1: Versuch 1: Reifungskurve der Erythropoese

Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

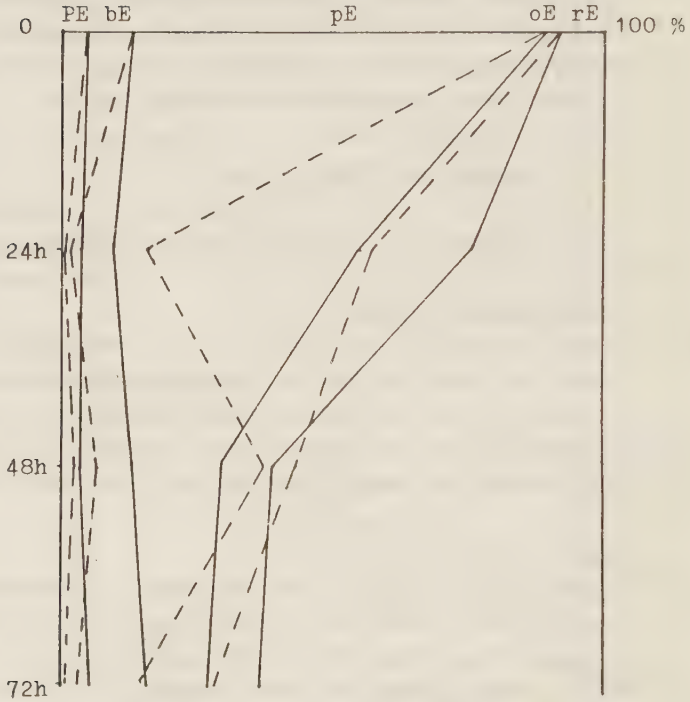


Abb. 2: Versuch 1: Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

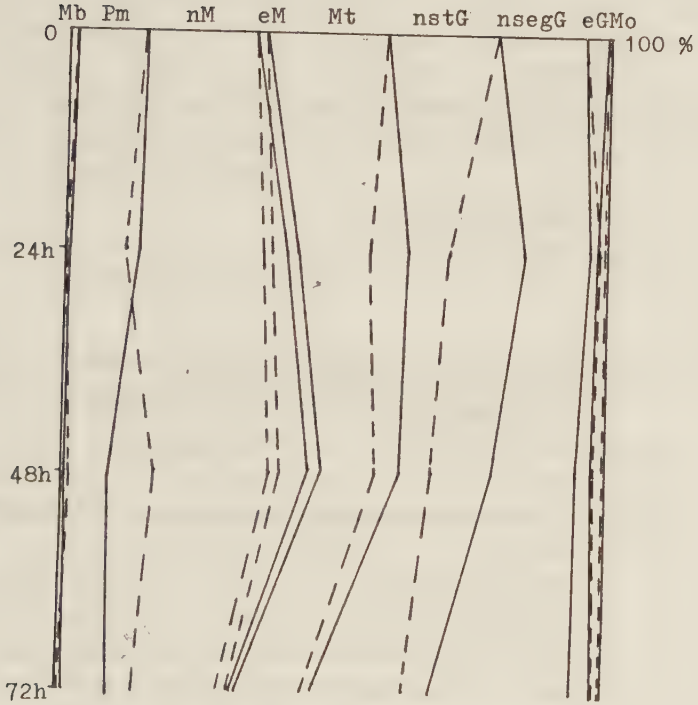


Tabelle 1: G/E - Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen

	Kontrolle				PRCA - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	2,7	2,6	2,9	3,9	2,4	5,3	5,8
2	1,1	1,2	1,2	1,2	1,7	2,7	4,7
3	1,8	1,6	2,1	2,3	2,5	2,4	2,6
4	2,1	2,2	2,1	4,9	1,9	1,9	3,0
Mittelwert	1,9	1,8	1,9	2,5	2,1	2,8	3,7

Mitose - Indices (Tab. 2 und 4)

Der Erythroblasten - Mitose - Index der Kontrolle steigt bis 48 h an und fällt erst nach 72 h. Der Erythroblasten - Mitose - Index bei PRCA - Serumzusatz zeigt eine kontinuierliche Abnahme unterhalb des Kontrollniveaus.

Der Granuloblasten - Mitose - Index der Kontrolle steigt bis 24 h etwas an und sinkt dann bis 72 h leicht unter das Ausgangsniveau von 10 ‰. Der Granuloblasten - Mitose - Index der Zusatzkulturen sinkt nach 24 h ab, steigt dann an und liegt bei 48 und 72 h über dem Kontrollniveau.

Tabelle 2: Erythroblasten - Mitose - Indices der Kontrolle und der Zusatzkulturen in %o

	Kontrolle				PRCA - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	17,5	15,2	30,7	14,9	15,0	15,1	10,0
2	18,0	12,3	9,8	4,5	5,9	8,8	0,0
3	12,7	16,8	10,5	21,4	12,0	20,0	4,4
4	11,6	17,7	11,1	-,-	19,6	3,2	13,1
Mittelwert	15,3	15,0	13,7	12,5	12,6	9,7	8,9

Tabelle 3: Mitose - Indices der einzelnen Reifungsklassen der Erythropoese in %o (Mittelwerte der Versuche 1 - 4)

	PE	bE	pE	oE
Kontrolle (0 - 72 h)	30,2	32,4	14,2	-,-
PRCA - Serumzusatz (24 - 72 h)	12,7	23,8	19,6	2,7

Tabelle 4: Granuloblasten - Mitose - Indices der Kontrolle und der Zusatzkulturen in %o

	Kontrolle				PRCA - Serumzusatz		
Versuch	Oh	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	10,0	12,4	10,8	9,1	1,5	19,0	13,8
2	12,9	17,7	7,5	0,0	18,2	12,6	0,0
3	7,0	17,2	27,2	16,1	13,1	7,8	9,0
4	11,6	5,3	20,7	-,-	6,5	14,3	23,4
Mittelwert	10,5	12,6	16,7	8,5	9,6	14,4	10,9

Tabelle 5: Mitose - Indices der einzelnen Reifungsklassen der Granulopoese in %o (Mittelwerte der Versuche 1 - 4)

	Pm	nM	eM
Kontrolle (0 - 72 h)	28,3	14,4	8,1
PRCA - Serumzusatz (24 - 72 h)	21,8	15,8	-,-

4.1.2. Versuch 2: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 3)
Es zeigt sich im gesamten Beobachtungszeitraum eine deutliche Zunahme der oxyphilen und reifen Erythroblasten unter PRCA - Serumzusatz. Der Anteil der anderen Zellen sinkt unterschiedlich stark.

Granulopoese (Abb. 4)
Nach PRCA - Serumzusatz erscheint die Granulopoese im Vergleich zur Kontrolle bei 24 und 48 h mäßig linksverschoben. Promyelozyten sind stark vermehrt vorhanden. Nach 72 h sind reife Zellformen deutlich stärker vertreten. Auffällig ist die Zunahme an neutrophilen segmentkernigen Granulozyten.

G/E - Index (Tab. 1)
Der G/E - Index bleibt bei der Kontrolle etwa konstant bei 1.2, steigt bei PRCA - Serumzusatz jedoch an.

Mitose - Indices (Tab. 2 und 4)
Der Erythroblasten - Mitose - Index der Kontrolle sinkt kontinuierlich im Beobachtungszeitraum. Der entsprechende Index bei PRCA - Serumzusatz liegt stets unter den Kontrollwerten.

Nach einem Anstieg bei 24 h fällt der Granuloblasten - Mitose - Index der Kontrolle. Bei Serumzusatz zeigt sich ein ähnlicher Verlauf auf leicht höherem Niveau. Nach 72 h sind bei Kontroll- und Zusatzkultur keine Mitosen mehr nachweisbar.

Abb. 3: Versuch 2: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

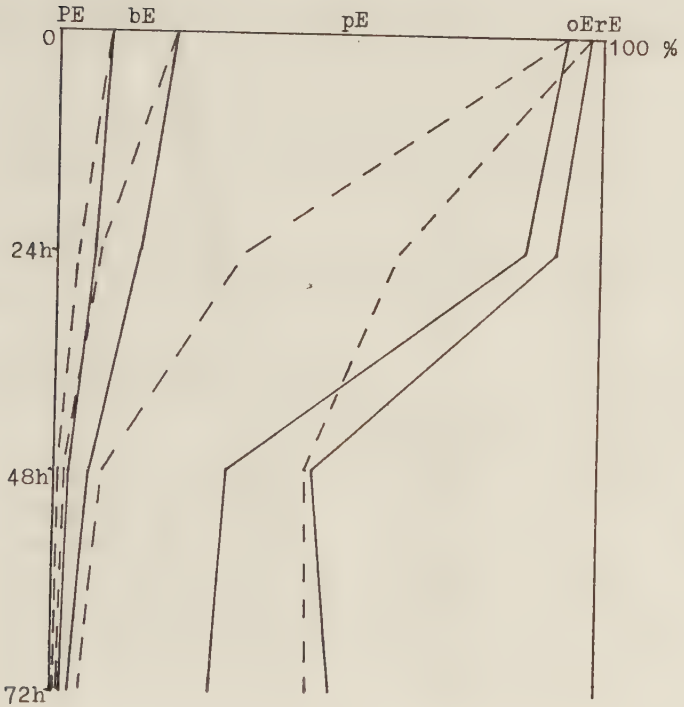
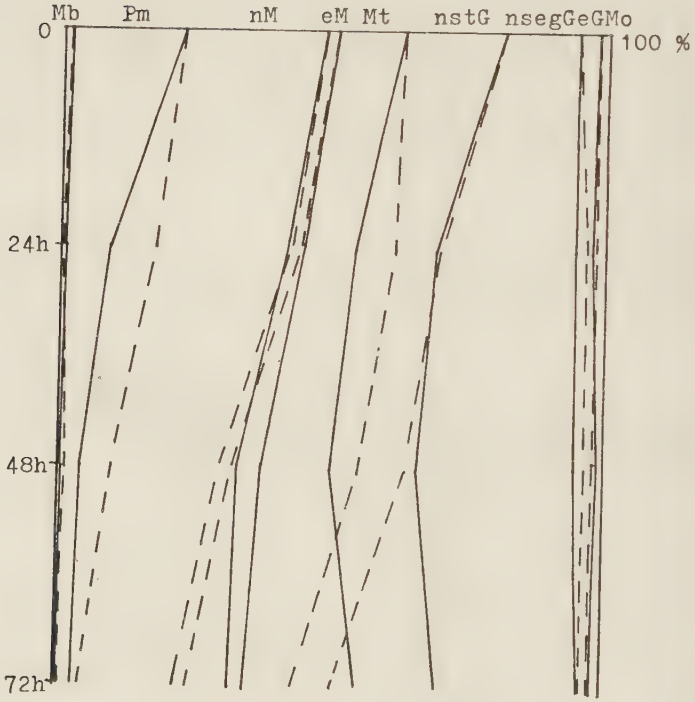


Abb. 4: Versuch 2: Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz



4.1.3. Versuch 3: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 5)

Im Vergleich zur Kontrolle ergibt sich unter PRCA - Serumzusatz eine deutliche Verschiebung hin zu reifen Erythroblasten, bei 72 h ist auch der Anteil der oxyphilen Erythroblasten bei den Zusatzkulturen höher als bei der Kontrolle.

Granulopoese (Abb. 6)

In der Granulopoese läßt sich bei PRCA - Serumzusatz eine Verschiebung zu reiferen Zellformen im Vergleich zur Kontrolle nach 48 und 72 h feststellen. Auffällig ist die Zunahme der Promyelozyten und der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Beobachtungszeitraum.

G/E - Index (Tab. 1)

Der G/E - Index liegt bei den Zusatzkulturen erst nach 72 h über dem der Kontrolle.

Mitose - Indices (Tab. 2 und 4)

Der Erythroblasten - Mitose - Index bei PRCA - Serumzusatz liegt nach 24 und 72 h deutlich unter den Kontrollwerten. Bei 48 h liegt der Erythroblasten - Mitose - Index unter PRCA - Serumzusatz höher.

Der Granuloblasten - Mitose - Index der Kontrolle steigt bis 48 h und fällt dann ab. Bei Serumzusatz erreicht dieser Index seinen höchsten Wert bereits nach 24 h. Im Beobachtungszeitraum liegt er stets unter den Kontrollwerten.

Abb. 5: Versuch 3: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

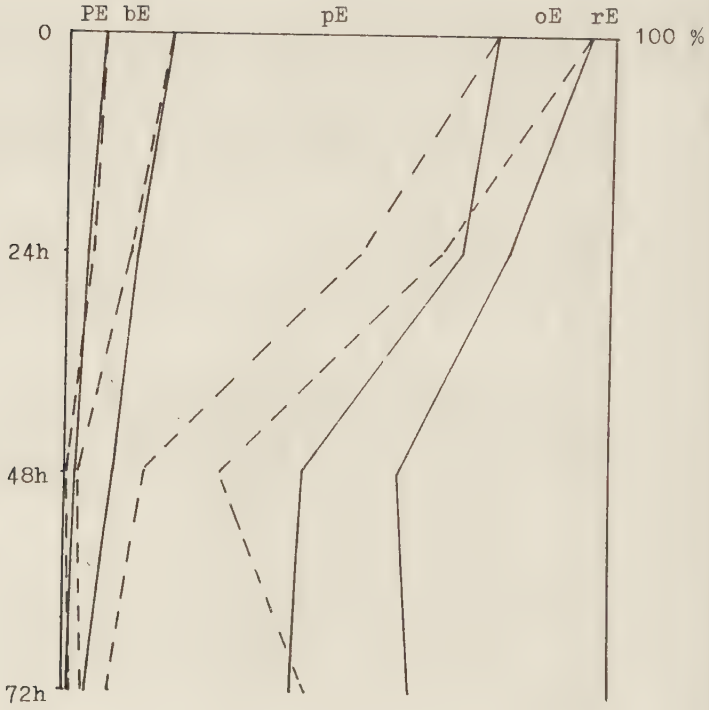
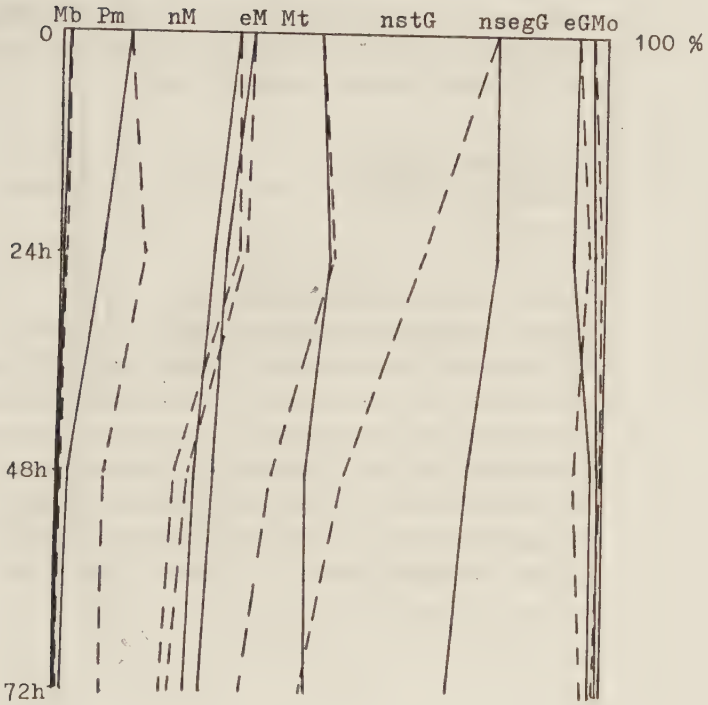


Abb. 6: Versuch 3: Reifungskurve der Granulopoese

Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz



4.1.4. Versuch 4: normales Knochenmark

Erythropoese (Abb. 7)

Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die Erythropoese unter PRCA - Serumzusatz eine Verschiebung zugunsten von oxyphilen und reifen Erythroblasten. Dieser Effekt ist nach 24 h am stärksten.

Granulopoese (Abb. 8)

Unter PRCA - Serumzusatz zeigt die Granulopoese eine deutliche Verschiebung hin zu reifen Zellformen nach 48 und 72 h. Promyelozyten und neutrophile segmentkernige Granulozyten treten vermehrt auf.

G/E - Index (Tab. 1)

Der G/E - Index ist unter PRCA - Serumzusatz im Zeitverlauf erniedrigt.

Mitose - Indices (Tab. 2 und 4)

Der Erythroblasten-Mitose-Index liegt nach Serumzusatz bei 24 h etwa auf dem Kontrollniveau. Bei 48 h ist er deutlich erniedrigt. Ein Vergleich mit dem Kontrollwert nach 72 h kann hier nicht dargestellt werden, da seine Bestimmung wahrscheinlich aus technischen Gründen nicht durchführbar war. Ähnliches gilt für die Granulopoese, deren Mitose - Indices nach 24 h kaum Abweichungen zeigen. Bei 48 h ist der Granuloblasten - Mitose - Index bei PRCA - Serumzusatz erniedrigt.

Abb. 7: Versuch 4: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

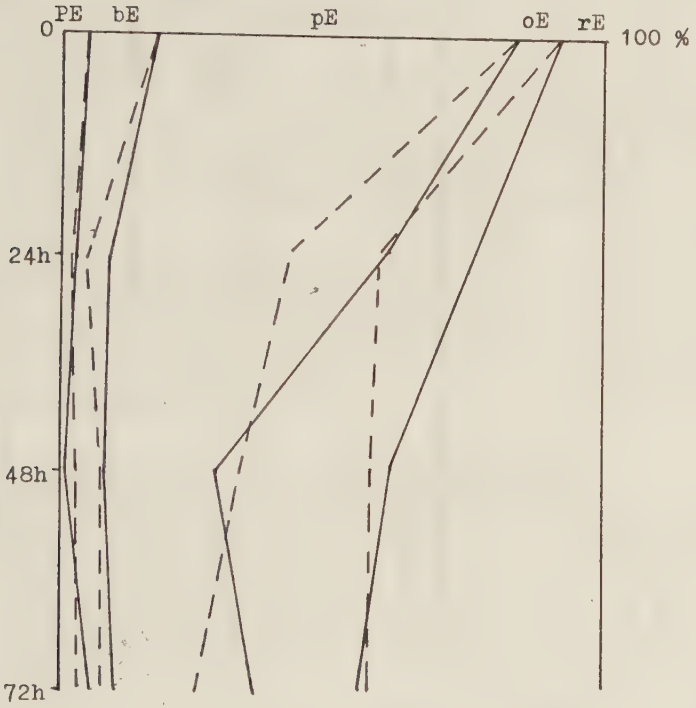
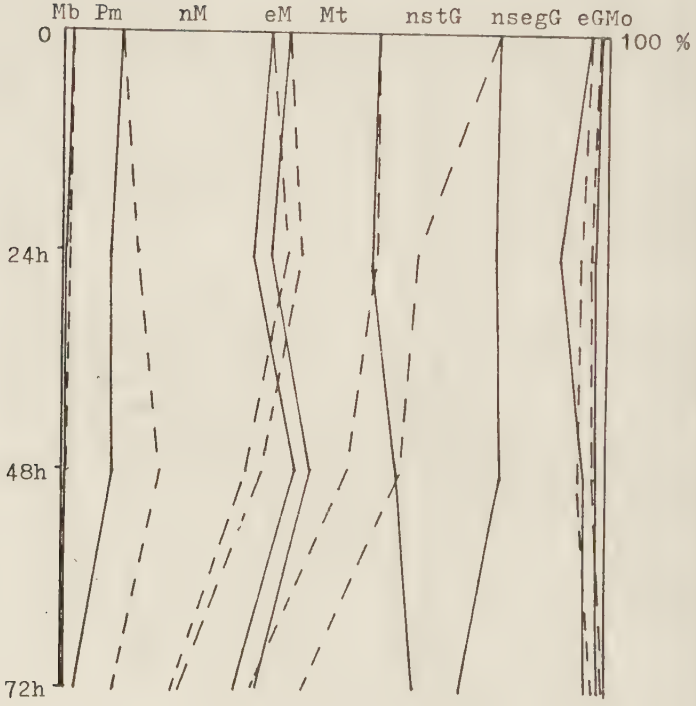


Abb. 8: Versuch 4: Reifungskurve der Granulopoese

Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz



4.1.5. Darstellung der Mittelwerte aus den Versuchen 1 - 4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Mittelwerte werden aus den absoluten Zahlenwerten errechnet.

Erythropoese (Abb. 9)

Hier zeigt sich nach PRCA - Serumzusatz eine deutliche Verschiebung zugunsten reiferer Formen, d.h. oxyphiler und reifer Erythroblasten. Dieser Effekt ist am stärksten nach 24 h. Bei polychromatischen Erythroblasten ist die größte Abnahme zu verzeichnen.

Granulopoese (Abb. 10)

Hier zeigt sich bei PRCA - Serumzusatz eine Vermehrung der teilungsfähigen Zellen, besonders der Promyelozyten, nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle. Diese geht bei 48 und 72 h in eine Verschiebung zugunsten der Granulozyten über.

G/E - Index (Tab. 1, Abb. 11)

Der G/E - Index steigt im Zeitverlauf sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Zusatzkulturen an, bei letzteren jedoch deutlich stärker. Dies liegt an einer zahlenmäßigen Abnahme erythropoetischer Zellen.

Mitose - Indices (Tab. 2, 3, 4, 5, Abb. 12, 13)

Beim Erythroblasten - Mitose - Index zeigt sich unter PRCA - Serumzusatz eine kontinuierliche Abnahme im Zeitverlauf. Im Vergleich zur Kontrolle liegen die Werte niedriger. Beim Vergleich der Reifungsklassen ist festzustellen, daß diese Erniedrigung auf Proerythroblasten und basophile Erythroblasten beschränkt ist.

Der Granuloblasten - Mitose - Index liegt bei 24 und 48 h nur mäßig unter den Kontrollwerten, nach 72 h leicht höher. Beim Vergleich der Reifungsklassen zeigt sich, daß der Mitose - Index der Promyelozyten erniedrigt ist und eosinophile Myelozyten keine mitotische Aktivität mehr zeigen.

Die Mitose - Indices der Reifungsklassen werden aus den Zahlenwerten der Versuche 1 - 4 über den gesamten Zeitraum ermittelt.

Abb. 9: Mittlere Reifungskurve der Erythropoese

Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

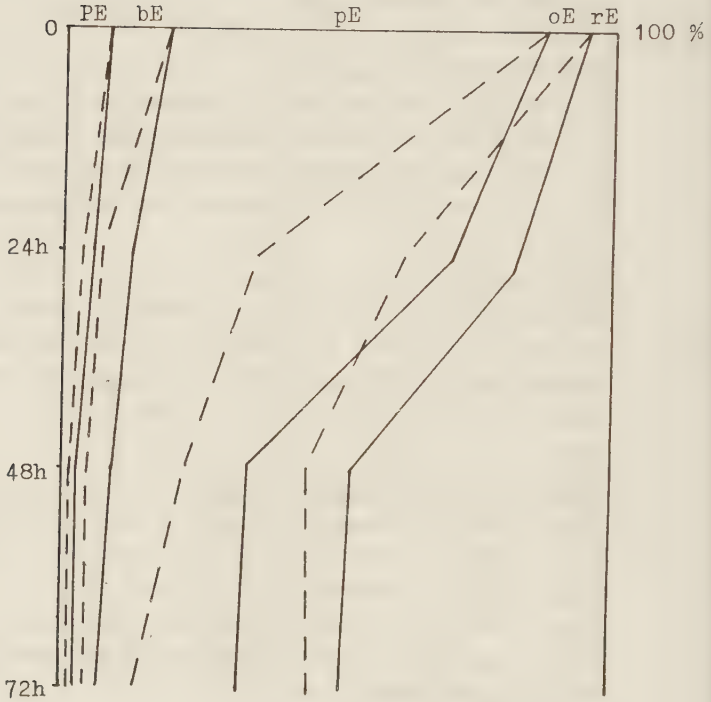


Abb. 10: Mittlere Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/PRCA

——— Kontrolle

- - - - PRCA - Serumzusatz

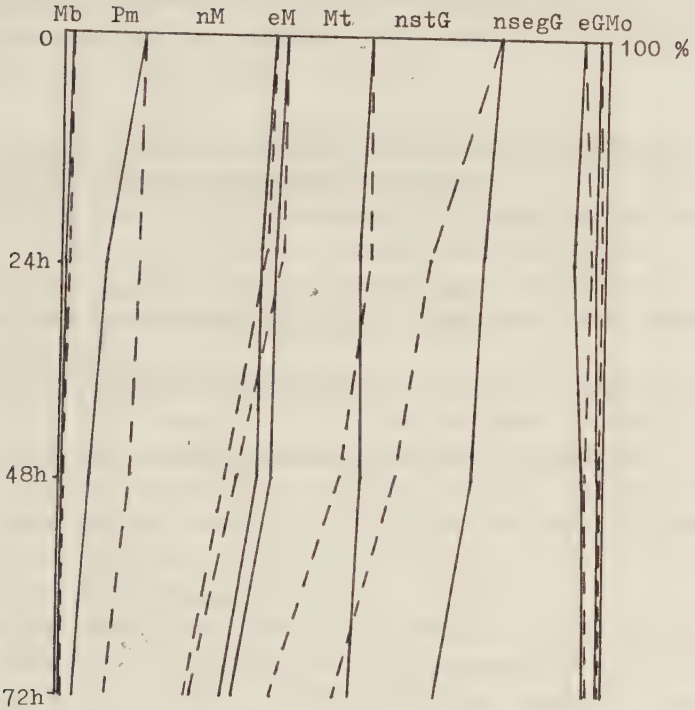


Abb. 11: Mittlere G/E - Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen

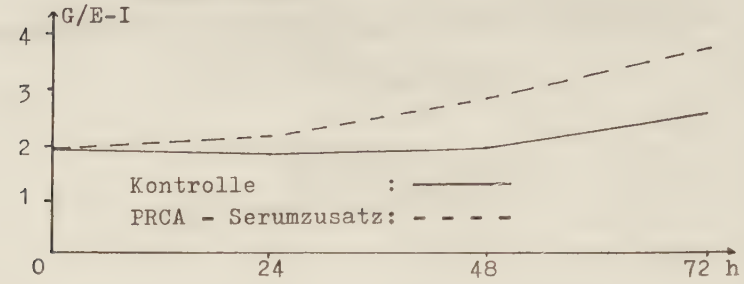


Abb. 12: Mittlere Mitose - Indices der Erythropoese in ‰

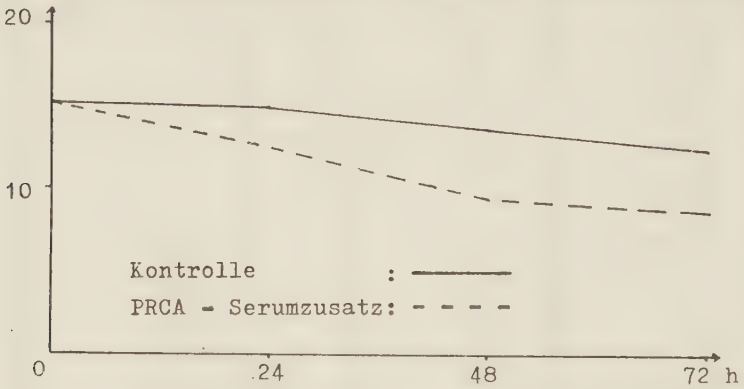
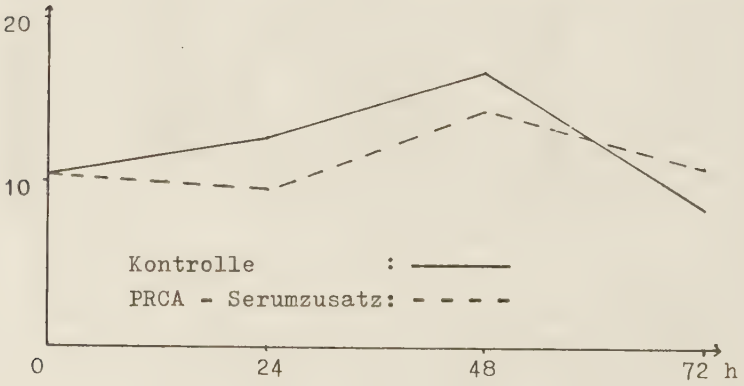


Abb. 13: Mittlere Mitose - Indices der Granulopoese in ‰



Karyologische Kurven (Abb. 14 und 15)

Die Mitosephasenverteilung, bezogen auf die Zahl der Mitosen der Versuche 1 - 4, ergibt für Erythropoese und Granulopoese unter PRCA - Serumzusatz kaum Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Ein Anhalt für eine Blockierung einer Mitosephase läßt sich nicht finden.

Signifikanzberechnungen (Tab. 6, 7, 8, 9)

Bei den Signifikanzberechnungen werden die Zahlenwerte der Versuche 1 - 4 zum jeweiligen Kontrollzeitpunkt zusammengefaßt. Signifikanz kann weder für die Mitosen der Erythropoese noch der Granulopoese nachgewiesen werden. Bei der Berechnung für die einzelnen Zellarten ergeben sich teilweise hoch signifikante Ergebnisse.

Große Retikulumzellen (einschließlich phagozytierende), Plasmazellen, Lymphozyten, Megakaryozyten

Der Anteil der großen Retikulumzellen (einschließlich der phagozytierenden) bezogen auf die Gesamtzellzahl (Tab. 10, Abb. 16) steigt im Zeitverlauf sowohl bei der Kontrolle als auch bei Serumzusatz an, bei den Zusatzkulturen jedoch zehnmal stärker.

Der Prozentsatz der Plasmazellen liegt in den Kontrollen immer unter 1 %, zeigt bis 48 h eine fallende Tendenz, steigt nach 72 h aber wieder an. Bei PRCA - Serumzusatz ergibt sich ein ähnlicher Verlauf auf erhöhtem Niveau (um 1%).

Der lymphozytäre Anteil liegt bei der Kontrolle durchweg bei 7 %. Bei Serumzusatz sinkt dieser Anteil leicht und in wechselnder Ausprägung ab (bis auf 5 %).

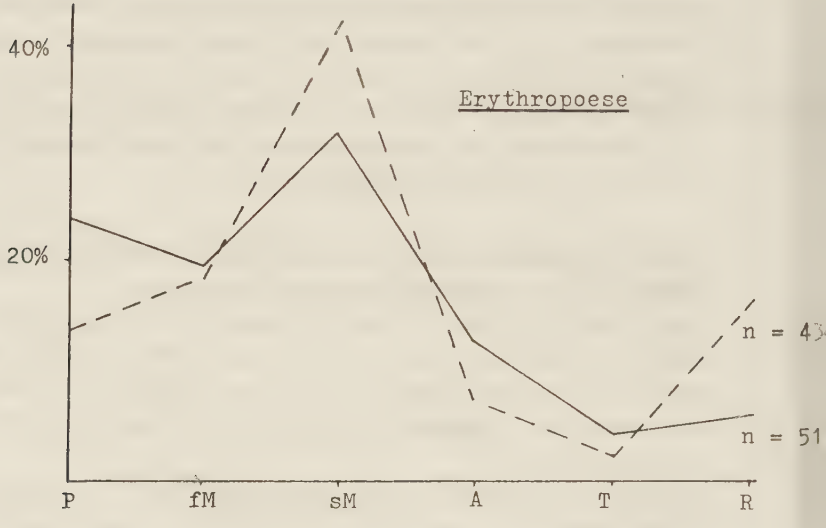
Megakaryozyten lassen sich in Kontroll- und Zusatzkulturen nur in sehr geringer Anzahl finden (prozentualer Anteil weit unter 0,5%). Unterschiede im Vergleich von Kontroll- und Zusatzkulturen lassen sich nicht finden.

Morphologische Veränderungen

Morphologische Veränderungen können bei Serumzusatz im Vergleich zur Kontrolle nicht gesehen werden.

Abb. 14 und 15: Mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese und Granulopoese

Kontrolle (einschließlich 0 h): ————
PRCA - Serumzusatz : - - - -
P - Prophase A - Anaphase
fM - frühe Metaphase T - Telophase
sM - späte Metaphase R - Rekonstruktionsphase



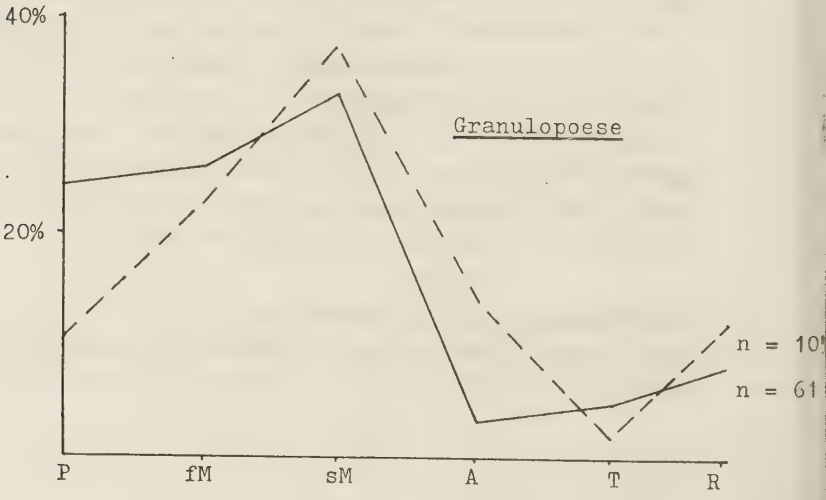


Tabelle 6: Signifikanzberechnung der Erythroblastenmitosen Kontrolle/PRCA - Serumzusatz

Zeit/h	K/Z	Mitosen	teilfg. Zellen	E_M	χ^2	p	Sign.
0	K	19	1243				
24	K	17	1131	15,18	0,33	0,58	nein
	Z	29	2297	30,82			
48	K	9	655	7,53	0,52	0,48	nein
	Z	8	823	9,47			
72	K	6	478[x]	4,99	0,35	0,56	nein
	Z	6	672	7,01			

Tabelle 7: Signifikanzberechnung der Granuloblastenmitosen Kontrolle/PRCA - Serumzusatz

Zeit/h	K/Z	Mitosen	teilfg. Zellen	E_M	χ^2	p	Sign.
0	K	14	1336				
24	K	17	1349	13,92	0,90	0,34	nein
	Z	42	4369	45,08			
48	K	22	1317	19,92	0,33	0,58	nein
	Z	39	2715	41,08			
72	K	8	939[x]	9,57	0,39	0,52	nein
	Z	24	2202	22,43			

x = Summe teilungsfähiger Zellen der Versuche 1 - 3

K = Kontrolle Z = PRCA - Serumzusatz E_M = Erwartungswert der Mitosen χ^2 = Ergebnis der Signifikanzberechnung
p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle) Sign. = Signifikanz

Tabelle 8: Signifikanzberechnung für die einzelnen Zellart der Erythropoese nach 24, 48 und 72 h (Versuche

24 h

Zell-art	K/Z	Zellzahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sig
PE	K	60	1361	43,69	8,86	0,003	ja
	Z	102	3709	118,51			
bE	K	99	1361	62,82	28,86	10^{-8}	ja
	Z	135	3709	171,18			
pE	K	810	1361	514,60	372,71	$<10^{-10}$	ja
	Z	1107	3709	1402,40			
oE	K	162	1361	299,31	110,37	$<10^{-10}$	ja
	Z	953	3709	815,69			
rE	K	230	1361	440,78	263,85	$<10^{-10}$	ja
	Z	1412	3709	1201,22			

48 h

Zell-art	K/Z	Zellzahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sig
PE	K	24	1255	22,05	0,29	0,76	nei
	Z	31	1875	32,95			
bE	K	80	1255	50,92	28,90	10^{-7}	ja
	Z	47	1875	76,08			
pE	K	314	1255	260,62	23,04	10^{-6}	ja
	Z	336	1875	389,38			
oE	K	237	1255	259,02	3,93	0,045	ja
	Z	409	1875	386,98			
rE	K	600	1255	662,38	20,77	5 10^{-6}	ja
	Z	1052	1875	989,62			

72 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
PE	K	20	1079	18,96	0,1	0,74	nein
	Z	25	1482	26,04			
bE	K	40	1079	28,65	8,0	0,005	ja
	Z	28	1482	39,35			
pE	K	298	1079	183,43	157,26	$<10^{-10}$	ja
	Z	135	1482	250,57			
oE	K	208	1079	291,55	56,68	$<10^{-10}$	ja
	Z	484	1482	400,45			
rE	K	513	1079	557,41	12,65	$4 \cdot 10^{-4}$	ja
	Z	810	1482	765,59			

K = Kontrolle Z = PRCA - Serumzusatz E_Z = Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

Tabelle 9: Signifikanzberechnung für die einzelnen Zellart der Granulopoese nach 24, 48 und 72 h (Versuche

24 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign
Mb	K	11	2409	11,08	0,0006	0,98	nein
	Z	36	7811	35,92			
Pm	K	231	2409	311,85	31,50	$3 \cdot 10^{-8}$	ja
	Z	1092	7811	1011,15			
eM	K	63	2409	46,91	7,36	0,008	ja
	Z	136	7811	152,09			
nM	K	627	2409	575,14	8,04	0,004	ja
	Z	1813	7811	1864,86			
Mt	K	417	2409	402,84	0,78	0,4	nein
	Z	1292	7811	1306,16			
nstG	K	551	2409	346,74	183,91	$<10^{-10}$	ja
	Z	920	7811	1124,26			
nsegG	K	370	2409	629,83	189,90	$<10^{-10}$	ja
	Z	2302	7811	2042,17			
eG	K	90	2409	50,91	40,12	$\approx 10^{-10}$	ja
	Z	126	7811	165,09			
Mo	K	43	2409	24,99	17,17	$2 \cdot 10^{-5}$	ja
	Z	63	7811	81,01			

K = Kontrolle Z = PRCA - Serumzusatz E_Z = Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

noch Tabelle 9:

48 h

Zellart	K/Z	Zellzahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
Mb	K	5	2407	8,44	2,04	0,15	nein
	Z	22	5289	18,56			
Pm	K	125	2407	253,65	106,14	$<10^{-10}$	ja
	Z	686	5289	557,35			
eM	K	69	2407	55,05	5,27	0,022	ja
	Z	107	5289	120,95			
nM	K	735	2407	514,80	174,34	$<10^{-10}$	ja
	Z	911	5289	1131,20			
Mt	K	383	2407	429,11	8,56	0,004	ja
	Z	989	5289	942,89			
nstG	K	497	2407	329,96	142,58	$<10^{-10}$	ja
	Z	558	5289	725,04			
nsegG	K	498	2407	722,16	144,65	$<10^{-10}$	ja
	Z	1811	5289	1586,84			
eG	K	64	2407	63,80	0,00	0,999	nein
	Z	140	5289	140,20			
Mo	K	29	2407	22,52	2,74	0,09	nein
	Z	43	5289	49,48			

K = Kontrolle Z = PRCA - Serumzusatz E_Z = Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

noch Tabelle 9:

72 h

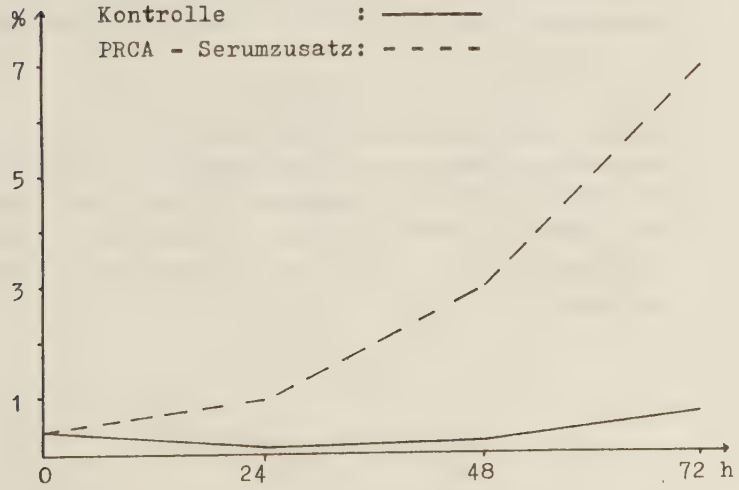
Zell-art	K/Z	Zellzahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
Mb	K	4	2709	4,93	0,27	0,6	nein
	Z	11	5527	10,07			
Pm	K	74	2709	177,62	96,40	$<10^{-10}$	ja
	Z	466	5527	362,38			
eM	K	59	2709	39,47	14,61	$2 \cdot 10^{-4}$	ja
	Z	61	5527	80,53			
nM	K	728	2709	507,20	170,22	$<10^{-10}$	ja
	Z	814	5527	1034,80			
Mt	K	578	2709	469,70	45,03	$<10^{-10}$	ja
	Z	850	5527	958,30			
nstG	K	475	2709	375,63	45,47	$<10^{-10}$	ja
	Z	667	5527	766,37			
nsegG	K	695	2709	1062,09	310,99	$<10^{-10}$	ja
	Z	2534	5527	2166,91			
eG	K	68	2709	50,98	8,62	0,003	ja
	Z	87	5527	104,02			
Mo	K	23	2709	16,78	3,46	0,06	nein
	Z	28	5527	34,22			

K = Kontrolle Z = PRCA - Serumzusatz E_Z = Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2 = Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

Tabelle 10: Große Retikulumzellen in % der Gesamtzellzahl (einschließlich phagozytierende)

	Kontrolle				PRCA - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0,6	0,3	0,0	0,3	0,2	1,1	2,6
2	0,4	0,0	0,5	0,1	0,4	3,4	7,4
3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	2,4	4,0
4	0,6	0,0	0,1	2,4	3,0	5,1	13,8
Mittelwert	0,4	0,1	0,2	0,7	1,0	3,0	7,0

Abb. 16: Mittlerer Anteil großer Retikulumzellen an der Gesamtzellzahl(in %)



4.2. Zusatz von OMS - Serum

Im folgenden sollen die Ergebnisse der Kulturen mit OMS - Serumzusatz den Kontrollkulturen gegenübergestellt werden. Die Darstellung von Kurven und Tabellen erfolgt in der gleichen Weise wie im vorangegangenen Abschnitt.

4.2.1. Versuch 1: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 17)
Die Erythropoese zeigt unter OMS - Serumzusatz eine deutli- stärkere Tendenz zur Ausreifung als bei der Kontrolle. Diese schwächt sich nach 72 h ab. Auffällig ist die prozentuale Zunahme der oxyphilen Erythroblasten nach 48 h.

Granulopoese (Abb. 18)
Hier zeigt sich bei OMS - Serumzusatz eine starke Verschie- bung zu reifen Zellformen. Der Anteil der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten nimmt deutlich zu. Die Verschiebung ist nach 24 h am stärksten und schwächt sich dann ab.

G/E - Index (Tab. 11)
Im Vergleich zur Kontrolle steigt der G/E - Index bei OMS - Serumzusatz nach 72 h deutlich an. Bei 24 und 48 h schwankt er um den Kontrollwert.

Mitose - Indices (Tab. 12 und 14)
Der Erythroblasten - als auch der Granuloblasten - Mitose - Index liegt bei OMS - Serumzusatz unter den Kontrollwerten. Beim Granuloblasten - Mitose - Index wird die Differenz zwischen Kontroll- und Zusatzkulturen im Zeitverlauf geringer.

Abb. 17: Versuch 1: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

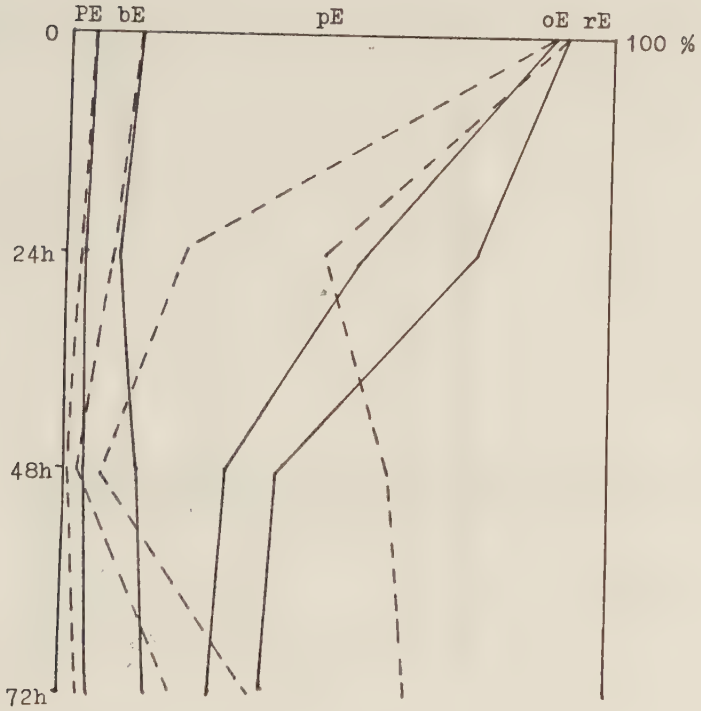


Abb. 18: Versuch 1: Reifungskurve der Granulopoese

Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

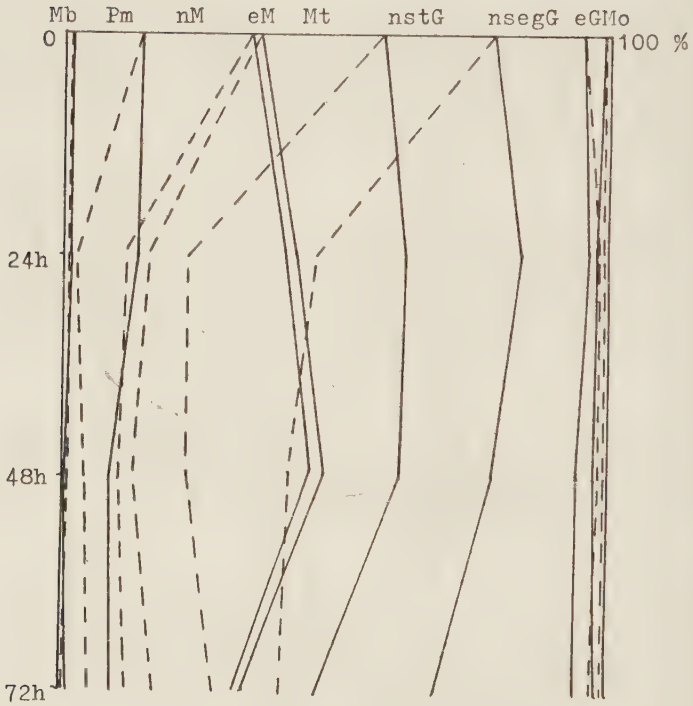


Tabelle 11: G/E - Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen

	Kontrolle				OMS - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	2,7	2,6	2,9	3,9	3,3	2,9	5,9
2	1,1	1,2	1,2	1,2	0,7	1,1	1,0
3	1,8	1,6	2,1	2,3	1,9	2,1	3,8
4	2,1	2,2	2,1	4,9	1,9	2,0	3,2
Mittel-wert	1,9	1,8	1,9	2,5	1,6	1,9	2,5

Tabelle 12: Erythroblasten - Mitose - Indices der Kontrolle und der Zusatzkulturen in %o

	Kontrolle				OMS - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	17,5	15,2	30,7	14,9	9,2	0,0	9,0
2	18,0	12,3	9,8	4,5	13,0	5,9	2,5
3	12,7	16,8	10,5	21,4	6,8	11,0	8,8
4	11,6	17,7	11,1	-,-	13,8	6,7	0,0
Mittel-wert	15,3	15,0	13,7	12,5	11,1	6,5	3,8

Tabelle 13: Mitose - Indices der einzelnen Reifungsklassen der Erythropoese in %o (Mittelwerte der Versuche 1 - 4)

	PE	bE	pE	oE
Kontrolle (0 - 72 h)	30,2	32,4	14,2	-,-
OMS - Serumzusatz (24 - 72 h)	25,6	22,3	11,0	-,-

Tabelle 14: Granuloblasten - Mitose - Indices der Kontroll und der Zusatzkulturen in %o

	Kontrolle				OMS - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	10,0	12,4	10,8	9,1	0,0	8,5	7,0
2	12,9	17,7	7,5	0,0	13,8	19,7	1,8
3	7,0	17,2	27,2	16,1	5,0	18,7	8,5
4	10,2	5,3	20,7	-,-	4,1	7,6	5,9
Mittelwert	10,5	12,6	16,7	8,5	6,4	15,2	5,5

Tabelle 15: Mitose - Indices der einzelnen Reifungsklassen der Granulopoese in %o (Mittelwerte der Versuche 1 - 4)

	Pm	nM	eM
Kontrolle (0 - 72 h)	28,3	14,4	8,1
OMS - Serumzusatz (24 - 72 h)	22,1	14,0	2,4

4.2.2. Versuch 2: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 19)
Im Vergleich zur Kontrolle zeigt die Erythropoese unter OMS - Serumzusatz eine verstärkte Tendenz zur Ausreifung. Nach 48 h zeigen sich bei OMS - Serumzusatz kaum Veränderungen im Vergleich zu den Werten nach 24 h.

Granulopoese (Abb. 20)
Hier ergibt sich bei OMS - Serumzusatz eine Linksverschiebung, die im wesentlichen an einer prozentualen Zunahme der Metamyelozyten liegt. Auch die Promyelozyten zeigen eine zahlenmäßige Zunahme, die aber schwächer ausgeprägt ist.

G/E - Index (Tab.11)
Der G/E - Index ist im Vergleich zur Kontrolle im gesamten Beobachtungszeitraum erniedrigt.

Mitose - Indices (Tab. 12 und 14)
Der Mitose - Index der Erythroblasten nimmt bei Kontroll- und Zusatzkulturen ständig ab. Nach 48 und 72 h ist er bei den Kulturen mit Serumzusatz stärker erniedrigt.

Der Granuloblasten - Mitose - Index ist nach 24 h bei OMS - Serumzusatz erniedrigt, nach 48 und 72 h erhöht.

Abb. 19: Versuch 2: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

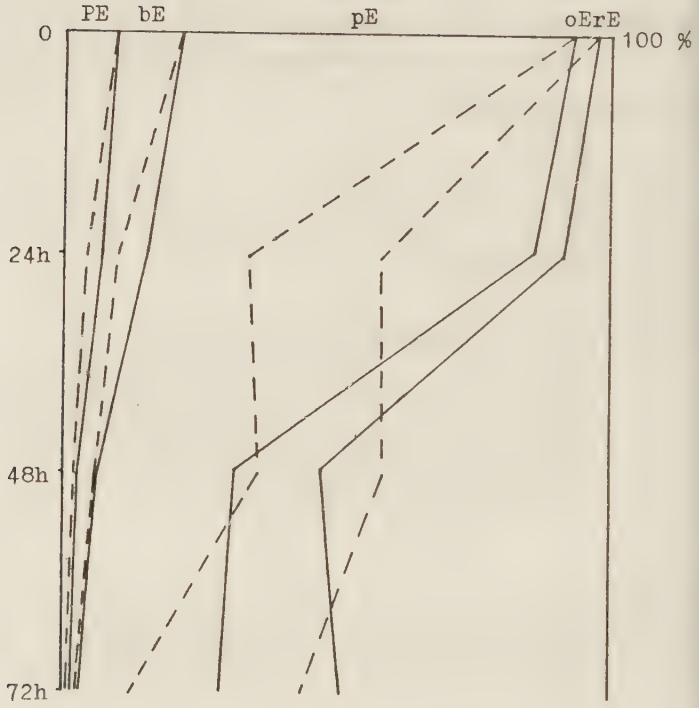
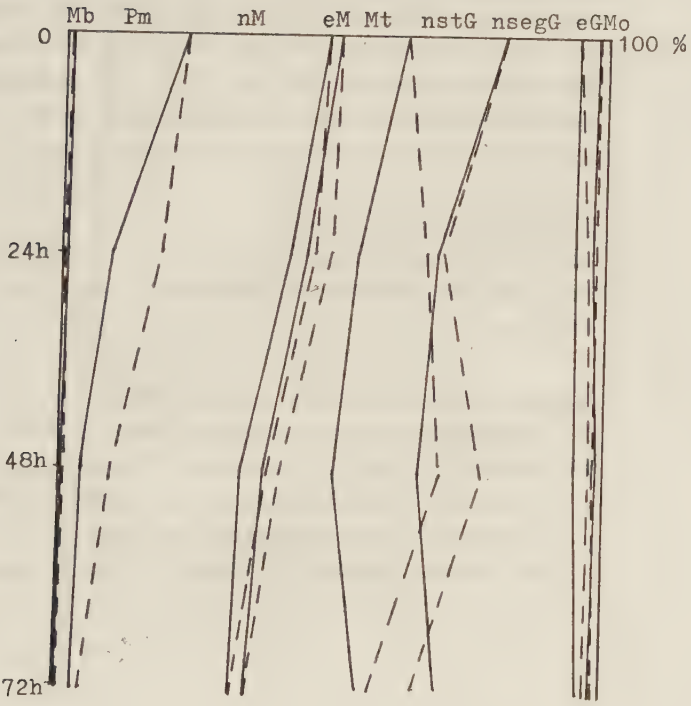


Abb. 20: Versuch 2: Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz



4.2.3. Versuch 3: Knochenmark bei Eisenmangelanämie

Erythropoese (Abb. 21)
Die Erythropoese zeigt bei OMS - Serumzusatz nach 24 h nur geringe Tendenz zu verstärkter Ausreifung, nach 48 h ist sie im Vergleich zur Kontrolle schwächer ausgeprägt. Nach 72 h jedoch läßt sich eine starke zahlenmäßige Vermehrung reifer Erythroblasten erkennen.

Granulopoese (Abb. 22)
Die Granulopoese zeigt bei Kulturen mit Serumzusatz nach leichter Linksverschiebung bei 24 h eine deutliche Tendenz zur Ausreifung nach 48 und 72 h. Die zahlenmäßige Zunahme der Promyelozyten und besonders der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten ist gut erkennbar.

G/E - Index (Tab. 11)
Der G/E - Index liegt unter OMS - Serumzusatz bis 48 h etwa auf dem Niveau der Kontrolle. Nach 72 h ist er erhöht.

Mitose - Indices (Tab. 12 und 14)
Der Erythroblasten - Mitose - Index liegt im Vergleich zur Kontrolle bei Kulturen mit Serumzusatz nach 24 und 72 h deutlich niedriger. Bei 48 h nähern sich die Werte von Kontroll- und Zusatzkulturen an.

Der Granuloblasten - Mitose - Index nimmt nach OMS - Serumzusatz deutlich ab.

Abb. 21: Versuch 3: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

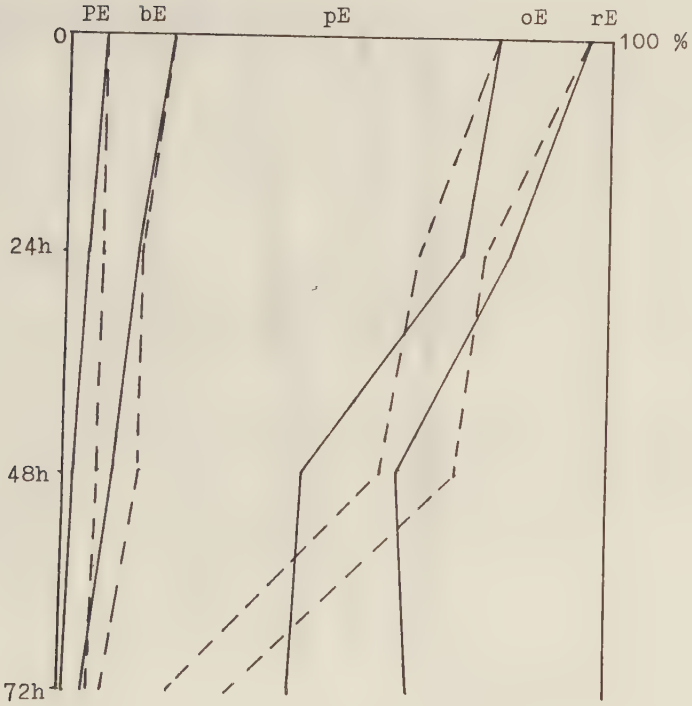
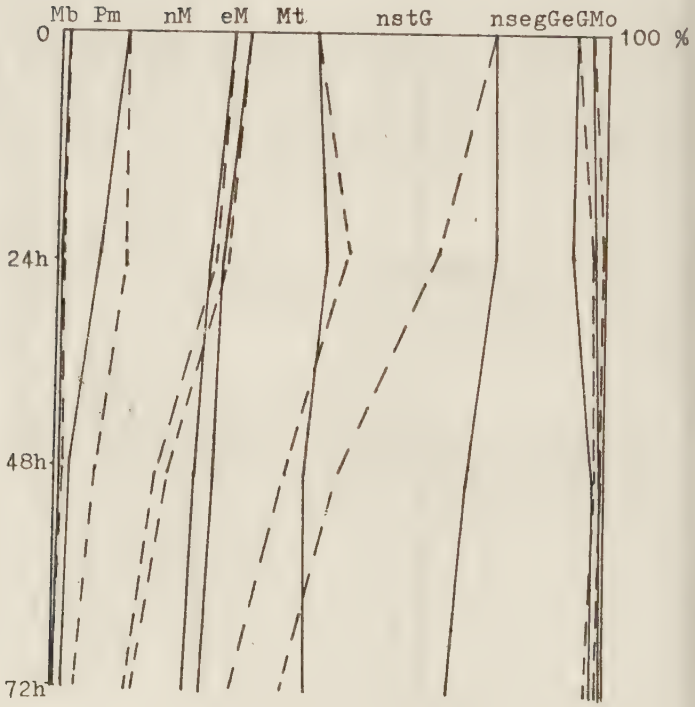


Abb. 22: Versuch 3: Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS-Serumzusatz



4.2.4. Versuch 4: normales Knochenmark

Erythropoese (Abb. 23)
Unter OMS - Serumzusatz reift die Erythropoese deutlich stärker aus als dies bei der Kontrolle der Fall ist. Der Anteil der reifen Erythroblasten nimmt stärker zu. Proerythroblasten zeigen eine prozentuale Zunahme bei 24 und 48 h.

Granulopoese (Abb. 24)
Unter OMS - Serumzusatz läßt sich schon ab 24 h eine deutliche Verschiebung zu reifen Zellformen erkennen. Der Anteil neutrophiler segmentkerniger Granulozyten an der Gesamtzahl granulopoetischer Zellen liegt teilweise über 50 %.

G/E - Index (Tab. 11)
Deutliche Veränderungen zeigen sich erst nach 72 h im Sinne einer Erniedrigung unter OMS - Serumzusatz.

Mitose - Indices (Tab. 12 und 14)
Soweit beurteilbar (vergleiche Versuch 4 bei PRCA - Serumzusatz), sind sowohl der Mitose - Index der Erythroblasten als auch der der Granuloblasten unter OMS - Serumzusatz erniedrigt.

Abb. 23:Versuch 4: Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

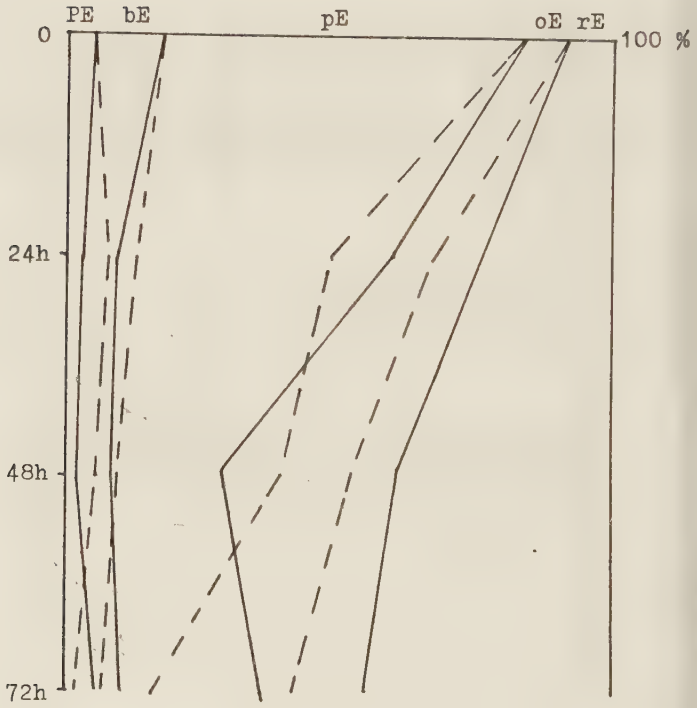
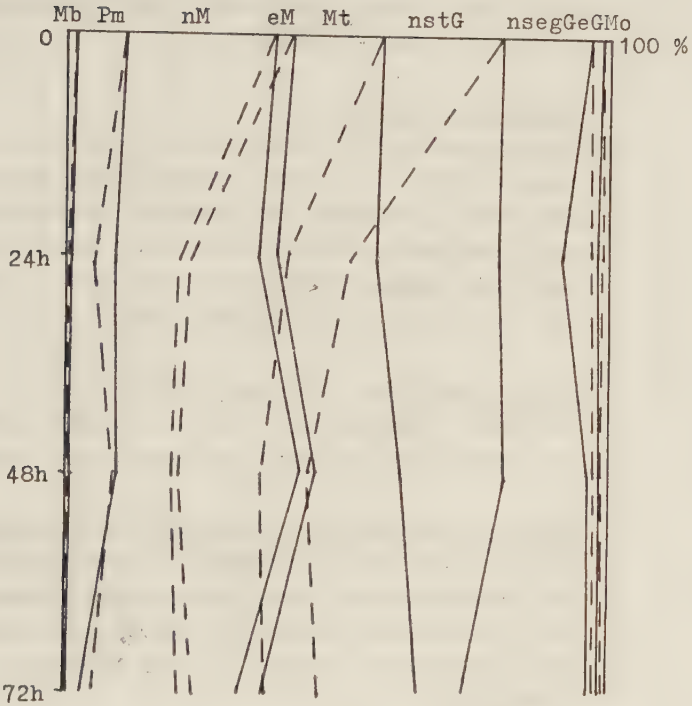


Abb. 24: Versuch 4: Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz



4.2.5. Darstellung der Mittelwerte aus den Versuchen 1 - Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Mittelwerte werden wiederum aus den absoluten Zahlenwerten errechnet. Die Berechnungen werden genauso wie im vorangegangenen Abschnitt durchgeführt.

Erythropoese (Abb. 25)
Im Vergleich zur Kontrolle reifen die Kulturen mit Serumzusatz deutlich stärker aus, insbesondere bei 24 und 72 h. Proerythroblasten sind unter OMS - Serumzusatz nach 48 h leicht vermehrt vorhanden.

Granulopoese (Abb. 26)
Hier entwickelt sich im Zeitverlauf eine starke Rechtsverschiebung unter OMS - Serumzusatz, bedingt durch eine prozentuale Abnahme der neutrophilen Myelozyten. Neutrophile segmentkernige Granulozyten sind im Zeitverlauf deutlich vermehrt vorhanden. Der Anteil der Promyelozyten ist nach 48 und 72 h leicht erhöht.

G/E - Index (Tab. 11, Abb. 27)
Der G/E - Index liegt im Beobachtungszeitraum bei Kontrol und Zusatzkulturen etwa auf gleichem Niveau.

Mitose - Indices (Tab. 12, 13, 14, 15, Abb. 28, 29)
Sowohl der Mitose - Index der Erythroblasten als auch der der Granuloblasten sind unter OMS - Serumzusatz erniedrig Im Vergleich zur Kontrolle ist diese Abnahme beim Granuloblasten - Mitose - Index nach 24 h am stärksten au geprägt.

Beim Vergleich der Reifungsklassen in Erythropoese und Granulopoese ist festzustellen, daß die Erniedrigung der Mitose - Indices in allen teilungsfähigen Reifungsstufen erkennbar ist, soweit dort Mitosen gefunden werden.

Abb. 25: Mittlere Reifungskurve der Erythropoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

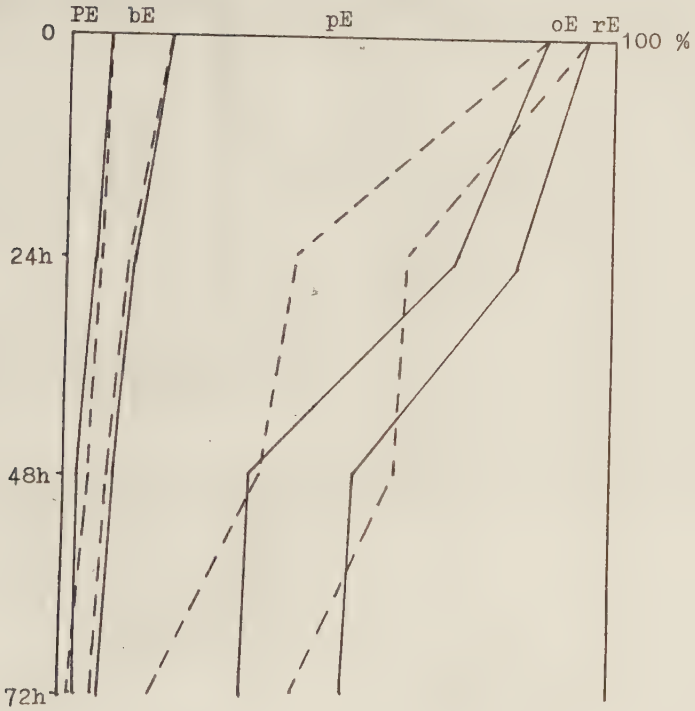


Abb. 26: Mittlere Reifungskurve der Granulopoese Kontrolle/OMS

——— Kontrolle

- - - - OMS - Serumzusatz

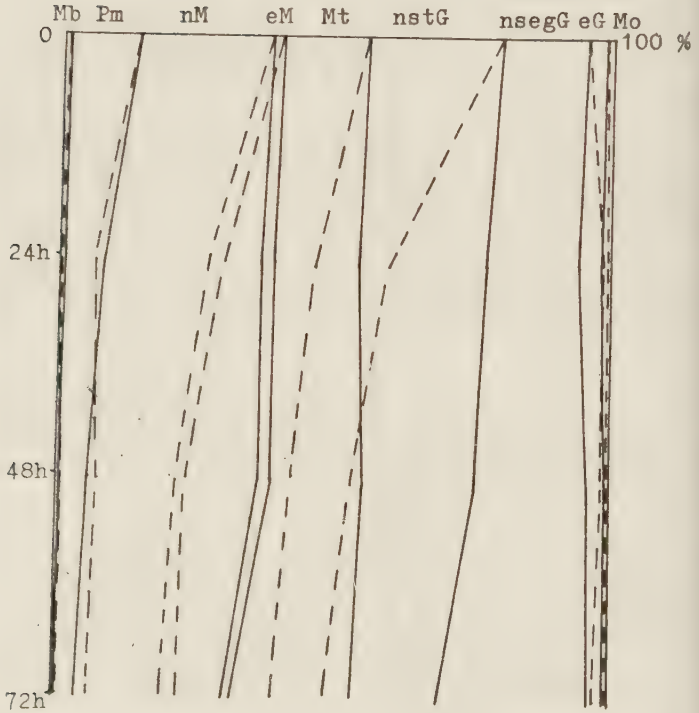


Abb. 27: Mittlere G/E - Indices der Kontroll- und Zusatzkulturen

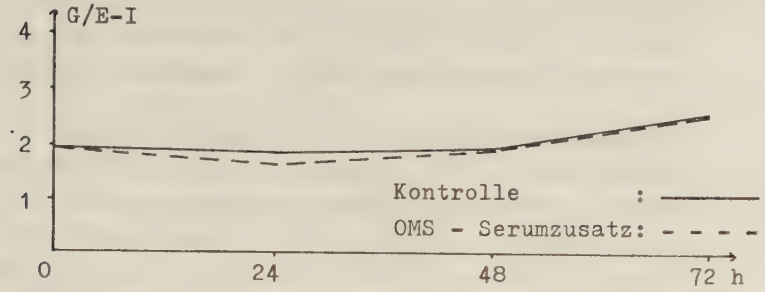


Abb. 28: Mittlere Mitose - Indices der Erythropoese in ‰

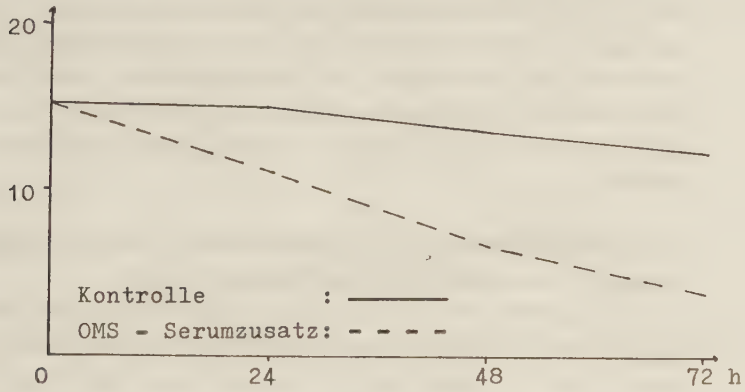
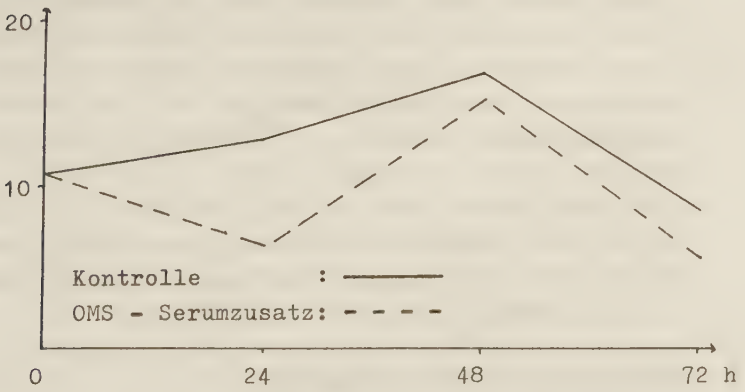


Abb. 29: Mittlere Mitose - Indices der Granulopoese in ‰



Karyologische Kurven (Abb. 30, 31)

Unter OMS - Serumzusatz sind Veränderungen bezüglich der Mitosephasenverteilung im Vergleich zur Kontrolle kaum vorhanden. Es sind nahezu alle Phasen vertreten; Hinweis für eine Blockierung einzelner Phasen sind nicht vorhand

Signifikanzberechnungen (Tab. 16, 17, 18, 19)

Für die Mitosen der Erythropoese kann im Vergleich zur Kontrolle keine Signifikanz berechnet werden. In der Granulopoese ist nach 24 h Signifikanz nachweisbar, nach 48 und 72 h kann sie auch hier nicht ermittelt werden.

Im Hinblick auf den Vergleich einzelner Zellarten könn mitunter hoch signifikante Unterschiede festgestellt wer so z.B. für die zahlenmäßige Zunahme von neutrophilen seg kernigen Granulozyten oder für die prozentuale Abnahme v neutrophilen Myelozyten und eosinophilen Granulozyten un Serumzusatz. Auch in der Erythropoese können prozentuale Unterschiede für einzelne Zellarten statistisch gut gesi werden.

Große Retikulumzellen (einschließlich phagozytierende), Plasmazellen, Lymphozyten, Megakaryozyten

Bei den großen Retikulumzellen (einschließlich den phago-zytierenden) zeigt sich, bezogen auf die Gesamtzellzahl, nach 48 und 72 h im Vergleich zur Kontrolle eine gering-fügige Zunahme unter OMS - Serumzusatz (Tab. 20, Abb. 32)

Der Anteil der Plasmazellen zeigt bei OMS - Serumzusat im Zeitverlauf eine leichte, aber kontinuierliche Abnahme höherem Niveau als bei den Kontrollkulturen (von 1,7 auf

Der Prozentsatz der Lymphozyten läßt unter OMS - Serum zusatz nach stärkerer Abnahme bei 24 h dann wieder eine leichte Zunahme erkennen. Im Vergleich zur Kontrolle lieg ihr Anteil immer niedriger (um 0,5 - 2 %).

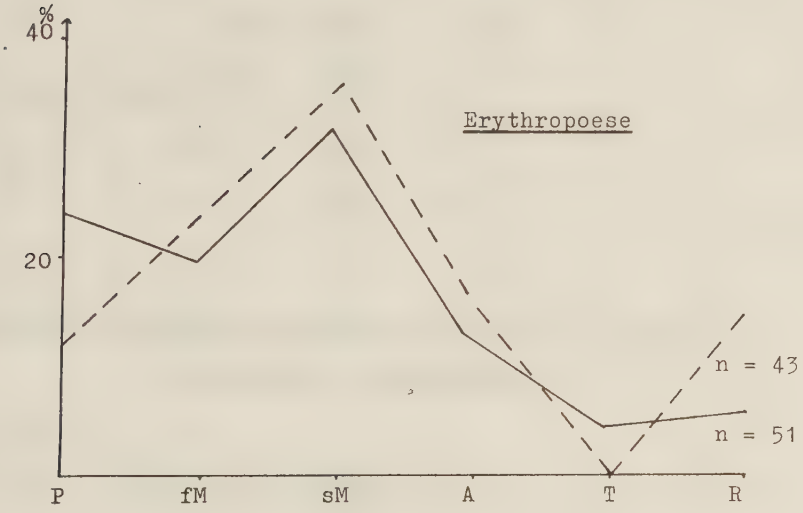
Megakaryozyten lassen sich in Kontroll- und Zusatzkult nur in sehr geringer Zahl finden (prozentualer Anteil wei unter 0,5 %). Unterschiede im Vergleich von Kontroll- und Zusatzkulturen lassen sich nicht finden.

Morphologische Veränderungen

Morphologische Veränderungen können bei Serumzusatz im Vergleich zur Kontrolle nicht gesehen werden.

Abb. 30 und 31: Mittlere Mitosephasenverteilung der Erythropoese und Granulopoese

Kontrolle (einschließlich 0 h): ————
OMS - Serumzusatz : - - - -
P - Prophase A - Anaphase
fM - frühe Metaphase T - Telophase
sM - späte Metaphase R - Rekonstruktionsphase



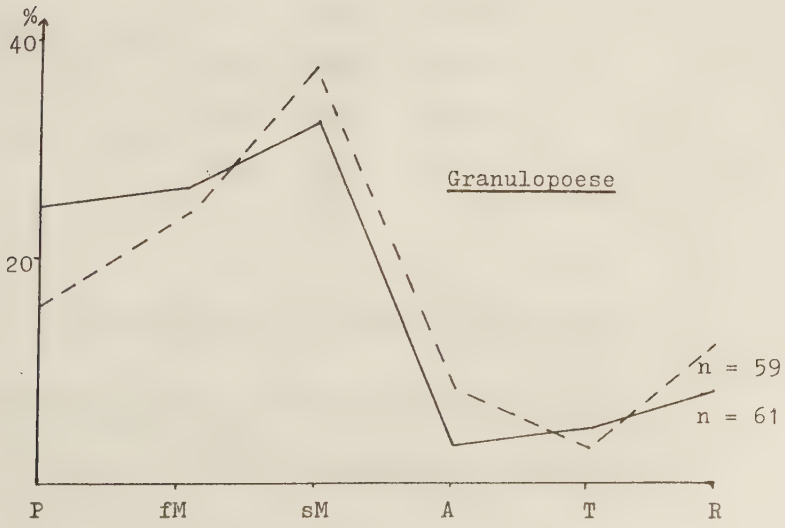


Tabelle 16: Signifikanzberechnung der Erythroblastenmitosen

Kontrolle/OMS - Serumzusatz

Zeit/h	K/Z	Mitosen	teilfg. Zellen	E_M	χ^2	p	Sign.
0	K	19	1243				
24	K	17	1131	13,92	0,98	0,32	nein
	Z	30	2689	33,08			
48	K	9	655	5,68	2,80	0,09	nein
	Z	10	1536	13,32			
72	K	6	478[x]	3,37	3,40	0,06	nein
	Z	3	800	5,63			

Tabelle 17: Signifikanzberechnung der Granuloblastenmitosen

Kontrolle/OMS - Serumzusatz

Zeit/h	K/Z	Mitosen	teilfg. Zellen	E_M	χ^2	p	Sign.
0	K	14	1336				
24	K	17	1349	11,22	4,36	0,034	ja
	Z	19	2980	24,78			
48	K	22	1317	20,77	0,12	0,72	nein
	Z	30	1980	31,23			
72	K	8	939[x]	6,13	0,86	0,38	nein
	Z	10	1820	11,87			

x = Summe teilungsfähiger Zellen der Versuche 1 - 3

K = Kontrolle Z = OMS - Serumzusatz E_M = Erwartungswert der Mitosen χ^2 = Ergebnis der Signifikanzberechnung
p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle) Sign. = Signifikanz

Tabelle 18: Signifikanzberechnung für die einzelnen Zellarten der Erythropoese nach 24, 48 und 72 h (Versuche 1-4

24 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
PE	K	60	1361	70,35	2,12	0,14	nein
	Z	231	4269	220,65			
bE	K	99	1361	80,50	5,99	0,015	ja
	Z	234	4269	252,50			
pE	K	810	1361	521,43	341,48	$<10^{-10}$	ja
	Z	1347	4269	1635,57			
oE	K	162	1361	251,17	51,19	$<10^{-10}$	ja
	Z	877	4269	787,83			
rE	K	230	1361	437,55	191,36	$<10^{-10}$	ja
	Z	1580	4269	1372,45			

48 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
PE	K	24	1255	38,70	8,61	0,003	ja
	Z	93	2539	78,30			
bE	K	80	1255	59,87	10,62	0,002	ja
	Z	101	2539	121,13			
pE	K	314	1255	341,70	4,62	0,03	ja
	Z	719	2539	691,30			
oE	K	237	1255	284,48	15,30	10^{-4}	ja
	Z	623	2539	575,52			
rE	K	600	1255	530,25	23,75	10^{-6}	ja
	Z	1003	2539	1072,75			

72 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl erythrop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
PE	K	20	1079	17,52	0,56	0,48	nein
	Z	28	1877	30,48			
bE	K	40	1079	39,06	0,03	0,86	nein
	Z	67	1877	67,94			
pE	K	298	1079	187,26	126,80	$<10^{-10}$	ja
	Z	215	1877	325,74			
oE	K	208	1079	254,78	17,73	$2 \cdot 10^{-5}$	ja
	Z	490	1877	443,22			
rE	K	513	1079	580,38	26,66	$3 \cdot 10^{-7}$	ja
	Z	1077	1877	1009,62			

K = Kontrolle Z = OMS - Serumzusatz E_Z= Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

Tabelle 19: Signifikanzberechnung für die einzelnen Zellarten der Granulopoese nach 24, 48 und 72 h (Versuche 1-4)

24 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
Mb	K	11	2409	7,60	2,06	0,14	nein
	Z	18	6788	21,40			
Pm	K	231	2409	201,16	6,11	0,02	ja
	Z	537	6788	566,84			
eM	K	63	2409	67,05	0,34	0,85	nein
	Z	193	6788	188,95			
nM	K	627	2409	461,26	99,78	$<10^{-10}$	ja
	Z	1134	6788	1299,74			
Mt	K	417	2409	396,83	1,66	0,1	nein
	Z	1098	6788	1118,17			
nstG	K	551	2409	411,50	77,27	$<10^{-10}$	ja
	Z	1020	6788	1159,50			
nsegG	K	370	2409	790,51	451,10	$<10^{-10}$	ja
	Z	2648	6788	2227,49			
eG	K	90	2409	40,60	119,77	$<10^{-10}$	ja
	Z	65	6788	114,40			
Mo	K	43	2409	24,36	19,52	10^{-5}	ja
	Z	50	6788	68,64			

K = Kontrolle Z = OMS - Serumzusatz E_Z= Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

noch Tabelle 19:

48 h

Zell-art	K/Z	Zell zahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
Mb	K	5	2407	6,94	0,81	0,36	nein
	Z	16	4872	14,06			
Pm	K	125	2407	144,50	4,20	0,04	ja
	Z	312	4872	292,50			
eM	K	69	2407	55,22	5,26	0,02	ja
	Z	98	4872	111,78			
nM	K	735	2407	458,65	307,34	$<10^{-10}$	ja
	Z	652	4872	928,35			
Mt	K	383	2407	424,92	7,51	0,006	ja
	Z	902	4872	860,08			
nstG	K	497	2407	353,82	101,47	$<10^{-10}$	ja
	Z	573	4872	716,18			
nsegG	K	498	2407	902,09	432,55	$<10^{-10}$	ja
	Z	2230	4872	1825,91			
eG	K	64	2407	33,07	43,82	10^{-10}	ja
	Z	36	4872	66,93			
Mo	K	29	2407	21,82	3,56	0,06	nein
	Z	37	4872	44,18			

K = Kontrolle Z = OMS - Serumzusatz E_Z= Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

noch Tabelle 19:

72 h

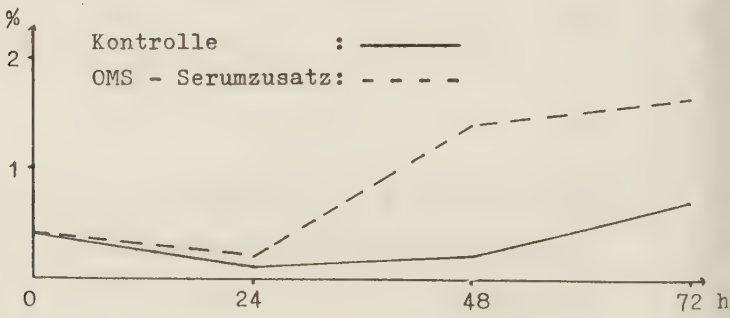
Zell-art	K/Z	Zellzahl	Zahl granulop. Zellen	E_Z	χ^2	p	Sign.
Mb	K	4	2709	2,90	0,66	0,44	nein
	Z	4	4756	5,10			
Pm	K	74	2709	96,53	8,56	0,003	ja
	Z	192	4756	169,47			
eM	K	59	2709	64,96	0,88	0,35	nein
	Z	120	4756	114,04			
nM	K	728	2709	524,38	153,90	$<10^{-10}$	ja
	Z	717	4756	920,62			
Mt	K	578	2709	495,35	26,49	$4 \cdot 10^{-7}$	ja
	Z	787	4756	869,65			
nstG	K	475	2709	337,13	101,07	$<10^{-10}$	ja
	Z	454	4756	591,87			
nsegG	K	695	2709	1111,54	415,48	$<10^{-10}$	ja
	Z	2368	4756	1951,46			
eG	K	68	2709	51,53	8,42	0,004	ja
	Z	74	4756	90,47			
Mo	K	23	2709	15,24	6,23	0,02	ja
	Z	19	4756	26,76			

K = Kontrolle Z = OMS - Serumzusatz E_Z= Erwartungswert der jeweiligen Zellart χ^2= Ergebnis der Signifikanzberechnung p = Wahrscheinlichkeitswert (Tabelle)
Sign. = Signifikanz

Tabelle 20: Große Retikulumzellen in % der Gesamtzellzahl (einschließlich phagozytierende)

	Kontrolle				OMS - Serumzusatz		
Versuch	0 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
1	0,6	0,3	0,0	0,3	0,1	0,1	0,4
2	0,4	0,0	0,5	0,1	0,0	0,2	0,8
3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,4	1,6	3,9
4	0,6	0,0	0,1	2,4	0,3	3,5	1,3
Mittelwert	0,4	0,1	0,2	0,7	0,2	1,4	1,6

Abb. 32: Mittlerer Anteil großer Retikulumzellen an der Gesamtzellzahl in %



5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat die Aufgabe, die Wirkung der Seren einer Patientin mit "Pure Red Cell Anemia" und eines Patienten mit "Osteomyelosklerose" auf normale menschliche Knochenmarkkulturen zu untersuchen. Durch diese Versuche können Serumfaktoren solcher Patienten in ihrer Wirkung beurteilt und Rückschlüsse auf mögliche pathogenetische Mechanismen gezogen werden. Ähnliche Untersuchungen sind uns aus der Literatur für die OMS nicht und für die PRCA nur unter Berücksichtigung anderer Parameter bekannt. Für die Beurteilung des Proliferations- und Reifungsverhaltens werden die Reifungskurven, die Mitose - Indices, die karyologischen Kurven und die morphologischen Veränderungen herangezogen. Differentialzählungen gestatten einen direkten Vergleich von Kontroll- und Zusatzkulturen.

Betrachtet man nun die Kontrollkulturen hinsichtlich der genannten Kriterien, so läßt sich eine normale Proliferations- und Reifungskinetik in Erythropoese und Granulopoese feststellen, wie sie bereits von I. BOLL und G. MERSCH (5, 6, 8, 9) beschrieben wurde. Das bedeutet, daß die gezeigten Veränderungen nach Serumzusatz tatsächlich auf diesen zurückzuführen sind und als Abweichung von den Referenzwerten angesehen werden können. Mögliche andere Ursachen sind aufgrund der Versuchsansätze zu vernachlässigen. Durch die Zugabe von Antibiotika zu den Kulturen ist eine Zerstörung der Zellen durch Bakterien ausgeschlossen. Die Verwendung homologer Materialien (menschliches Plasma und Knochenmark) läßt die Bildung von Antikörpern während der Inkubationszeit (drei Tage) als unmöglich erscheinen. Die Konzentration des Serumzusatzes (40 %) erscheint ausreichend vor dem Hintergrund teilweise hoch signifikanter Ergebnisse.

5.1. Zusatz von PRCA - Serum

Erythropoese: Vergleicht man die experimentellen Ergebnisse verschiedener Autoren (18, 27, 28, 32, 33, 34, 40), so besteht im allgemeinen Einigkeit in der Tatsache, daß es sich bei der chronischen Erythroblastopenie des Erwachsenenalters um eine Autoimmunerkrankung handelt. Diese Annahme wird durch Behandlungserfolge durch immunsuppressive Therapie bestätigt (23, 35, 37, 40, 51, 58).

Für die Entstehung der Erkrankung werden zwei unterschiedliche pathogenetische Mechanismen diskutiert:

1) Antikörper der IgG - Klasse, die gegen Erythroblasten gerichtet sind
2) Antikörper der IgG - Klasse, die gegen Erythropoetin gerichtet sind.

A. MARMONT (40) teilt die PRCA deshalb ein in einen Typ A (Antikörper gegen Erythroblasten) und in einen Typ B (Antikörper gegen Erythropoetin), wobei der Typ B sehr selten vorkommt.

B. LÖWENBERG (38) und K.F. MANGAN (39) konnten anhand von Stammzelluntersuchungen unter Zusatz von gereinigten Antikörpern oder Patientenseren eine deutliche Abnahme der Kolonienzahl nachweisen. Diese entspricht einer zahlenmäßigen Verringerung unreifer erythropoetischer Zellen (CFU-e). Nach Meinung von B. LÖWENBERG (38) entsprechen CFU-e solchen Zellen, die nicht reifer als basophile Erythroblasten sind. Gegen Erythroblasten gerichtete Antikörper konnten auch von S.B. KRANTZ (32) und E. ROMANO (49) nachgewiesen werden. S.B. KRANTZ (36) konnte durch ferrokinetische Untersuchungen ferner zytotoxische IgG - Antikörper zeigen. J.H. JEPSON (27, 28) und A. MARMONT (40) wiesen Antikörper gegen Erythropoetin mit Hilfe von Tierversuchen nach.

In den eigenen Untersuchungen kann ein deutlich hemmender Effekt auf die Erythropoese ebenfalls nachgewiesen werden. Dieser äußert sich neben einer Erhöhung des

G/E - Index im Vergleich zur Kontrolle in einer prozentualen Verringerung des Anteils der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten an der Gesamtzahl erythropoetischer Zellen. Ferner werden neben einer Verringerung des gesamten Erythroblasten - Mitose - Index besonders die Indices der Proerythroblasten und der basophilen Erythroblasten gegenüber der Kontrolle vermindert, was als Hemmung der Proliferation und damit als zytotoxischer Effekt gedeutet werden kann. Dies bestätigt die bereits erwähnten Ergebnisse von B. LÖWENBERG (38) und K.F. MANGAN (39), die einen hemmenden Effekt auf Zellen dieser Reifestufe nachweisen konnten.

Bemerkenswert allerdings ist die Zunahme der Mitose - Indices der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten. Soweit beurteilbar könnte dies bedeuten, daß die Antikörper im Plasma dieser Patientin ausschließlich gegen Zellen gerichtet sind, deren Reifung nicht über das Stadium des basophilen Erythroblasten hinaus fortgeschritten ist. Daher können Ergebnisse von S.B. KRANTZ (34, 35, 36) hier nicht voll bestätigt werden, die den IgG-Antikörpern auch einen hemmenden Effekt auf die Hämsynthese zuschreiben. Geht man davon aus, daß die Hämsynthese bei polychromatischen Erythroblasten und reiferen Formen im Vordergrund steht, so müßten diese Antikörper auch eine Zellschädigung dieser Reifungsstufen hervorrufen. Dies müßte dann allerdings auch eine Abnahme des Mitose - Index nach sich ziehen, was aber, wie schon erwähnt nicht der Fall ist. Die Überlegungen schließen eine Synthesestörung bei unreiferen Vorstufen natürlich nicht aus.

Die starke prozentuale Verringerung der polychromatischen Erythroblasten ließe sich nach dem gesagten auf zwei Effekte zurückführen:

1) Durch die Schädigung von Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten und der damit verminderten Proliferation verringert sich der Zellanteil, der zu polychromatischen Erythroblasten heranreift.

2) Durch Ausreifung nimmt der Anteil der polychromatischen Erythroblasten zusätzlich ab bei gleichzeitiger zahlenmäßiger Zunahme oxyphiler und reifer Erythroblasten.

Ob der erhöhte Mitose - Index der eben genannten Zellarten als eine Form der Kompensation (z.B. Abschwächung ineffektiver Erythropoese) zu Beginn der Erkrankung aufzufassen ist, kann hier nur als Hypothese formuliert werden.

Interessant ist ferner die Frage, ob die PRCA bei dieser Patientin durch Antikörper gegen Erythroblasten oder gegen Erythropoetin ausgelöst wurde. Wir kommen zu dem Schluß, daß es sich um Antikörper gegen Erythroblasten handelt. Dies läßt sich folgendermaßen begründen:
Die Anämie führt zur Ausschüttung von Erythropoetin. Diese Freisetzung führt nach P. DÖRMER (17) zur Verkürzung der Generationszeit. Diese äußert sich in den eigenen Untersuchungen in einer Erhöhung des Mitose - Index besonders der polychromatischen Erythroblasten. Aufgrund der Antikörper gegen Proerythroblasten und basophile Erythroblasten wird der Mitose - Index dieser Zellarten erniedrigt, so daß der gesamte Erythroblasten - Mitose - Index ebenfalls verringert wird. Antikörper gegen Erythropoetin hätten eine verstärkte Proliferation reiferer Zellarten nicht zugelassen. Unterstützt wird diese Annahme durch Ergebnisse aus Tierversuchen, bei denen nach Injektion von PRCA - Serum mit Antikörpern gegen Erythropoetin in polyzythaemische Mäuse keine erythropoetische Aktivität mehr nachzuweisen war (J.H. JEPSON; 27, 28).

Die karyologischen Kurven geben keinen Anhalt für eine Hemmung einzelner Mitosephasen. Dies ist auch von anderen Autoren nicht beschrieben. Die prozentuale Abnahme an Prophasen bei PRCA - Serumzusatz könnte ein Hinweis dafür sein, daß weniger Zellen in die Mitose eintreten. Prophasen

wurden in der Kontrolle gehäuft bei Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten gesehen. Daraus läßt sich der Effekt der Antikörper erneut erkennen.

Morphologische Veränderungen im Sinne von lytischen Effekten können in den Kulturen nicht gesehen werden. Dies bestätigt Ergebnisse von S.B. KRANTZ (36), der in seinen Untersuchungen zwar zytotoxische Reaktionen, aber keinen direkten Anhalt für Zellysen finden konnte.

Granulopoese: Einflüsse der PRCA auf die myeloische Reihe werden in der Literatur nur selten beschrieben (32, 40). S.B. KRANTZ (32) und A. MARMONT (40) beschreiben in ihren Untersuchungen leichte zytoplasmatische oder granuläre Immunfluoreszenz. S.B. KRANTZ führt diesen Effekt auf unspezifische Antikörper infolge häufiger Bluttransfusionen zurück. Die eigenen Untersuchungen zeigen eine deutliche Regenerationshemmung der Granulopoese. Diese äußert sich in einer starken prozentualen Zunahme neutrophiler segmentkerniger Granulozyten bei gleichzeitiger Abnahme an teilungsfähigen Zellen, insbesondere der neutrophilen Myelozyten. Die einzige Ausnahme bilden die Promyelozyten, die im Zeitverlauf stets vermehrt vorhanden und nach 24 h für die Linksverschiebung der myeloischen Reihe verantwortlich sind. Der Anteil aller anderen teilungsfähigen Zellen ist zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Unspezifische Antikörper durch Bluttransfusionen können hierfür nicht verantwortlich gemacht werden, da die Patientin bis zum Zeitpunkt der Blutabnahme keine Transfusionen und auch sonst keine Therapie erhielt, die eine verminderte regenerative Aktivität zur Folge haben könnte. Auch der zum selben Zeitpunkt diagnostizierte Harnwegsinfekt kann in einem Fall hier keine Rolle spielen. Er hätte im Blutbild eine Leukozytose und im Knochenmark eine Linksverschiebung bewirkt. Beides war nicht nachzuweisen, so daß die Veränderungen in

der Granulopoese auf die Wirkung pathologischer Substanzen zurückzuführen sind, die hier im Zusammenhang mit der PRCA auftreten. Folgende Mechanismen kommen in Betracht:

1) Eine allgemeine Reifungsförderung
2) Eine Reifungshemmung unreifer Vorstufen mit sonst normaler Ausreifung
3) Eine verminderte Proliferation mit relativer Vermehrung neutrophiler segmentkerniger Granulozyten

Die Reifungsförderung erscheint unwahrscheinlich, da aus der Krankengeschichte oder den Laborbefunden kein Anhalt für einen die Reifung in vitro stimulierenden Faktor zu finden ist. Die eigenen Ergebnisse lassen eher die verminderte Proliferation als eine mögliche Ursache erscheinen. Wir können feststellen, daß insbesondere der Mitose - Index der Promyelozyten gegenüber der Kontrolle vermindert ist, während er bei den neutrophilen Myelozyten kaum Veränderungen zeigt. Für eine Reifungshemmung spricht die prozentuale Abnahme der neutrophilen Myelozyten bei gleichzeitiger Zunahme an Promyelozyten.

Von B. LÖWENBERG (38) wurde die Auffassung vertreten, daß zytotoxische Antikörper auch gegen noch unreifere Zellen als CFU-e gerichtet sind. Dies könnte bedeuten, daß in unserem Fall Zellen betroffen sind, die noch nicht für die Erythropoese determiniert sind. Möglich wäre auch, daß die Antikörper nicht streng spezifisch sind. Die Folge wäre ein, wenn auch schwächerer, hemmender Einfluß auf die Granulopoese. Die aus den so geschädigten Zellen entstehenden Promyelozyten scheinen dann nicht mehr in der Lage zu sein, die durch Ausreifung abnehmende Zahl von neutrophilen Myelozyten auszugleichen. Nach dem oben gesagten, scheint eine Kombination aus Proliferations- und Reifungshemmung für den Einfluß auf die Granulopoese verantwortlich zu sein.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß sich im Knochenmark der Serumspenderin nach dreiwöchiger Therapie mit Corticosteroiden (Ultracorten^{R}50 mg/d) nicht nur in der Erythropoese sondern auch in der Granulopoese eine Linksverschiebung zeigte.

Die karyologischen Kurven zeigen bis auf eine Verringerung an Prophasen keine Veränderungen. Diese Abnahme könnte durch die Proliferationshemmung der Promyelozyten begründet sein.

Sonstige Zellen: In den Kulturen mit Serumzusatz kann neben den Wirkungen auf Erythropoese und Granulopoese auch eine deutliche Vermehrung großer Retikulumzellen (Histiozyten) gesehen werden, wie dies auch von W. QUEISSER (48) beschrieben wird. Nach I. BOLL (10) ist der Histiozyt die Endzelle der Stammzellreihe. E.O. FIELD (18) konnte durch Versuche an Mäusen zeigen, daß durch das Serum eines Patienten mit chronischer Erythroblastopenie den Stammzellen die Fähigkeit genommen wird, in das erythropoetische Kompartiment einzuwandern. Nach dem Stammzellmodell von I. BOLL (10) hat ein Proerythroblast aber dann nur noch die Möglichkeit, zum Histiozyten zu reifen.

In unserem Fall könnte dies folgendes bedeuten: Durch einen Erythropoetinstimulus werden zunächst mehr Stammzellen für die Erythropoese bereitgestellt (17). Aufgrund der Antikörper werden die Zellen jedoch geschädigt und so die Einwanderung in das erythropoetische Kompartiment behindert. Sie entwickeln sich zu Histiozyten. Diese Abfolge könnte den zahlenmäßigen Anstieg unter Serumzusatz auf das zehnfache gegenüber den Kontrollwerten erklären.

5.2. Zusatz von OMS - Serum

Erythropoese: Bei der OMS sind Untersuchungen über den Eisenstoffwechsel und die Erythrozytenkinetik häufiger Bestandteil experimenteller Arbeiten (12, 21, 30, 52, 53, 5
Hierbei wird von mehreren Autoren (12, 21, 30, 52) anhand ferrokinetischer Parameter die Erythropoese zumindest teilweise als ineffektiv bezeichnet. Nach Ansicht von I. BOLL (5) bedeutet ineffektive Erythropoese jedoch nicht Zelltod, sondern Wegfall von Mitosen. Die Folge ist dann eine Reduktion des Mitose - Index. Diese Ineffektivität kann in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Wir finden hier den gesamten Mitose - Index der Erythroblasten wie auch den der einzelnen Zellarten erniedrigt. Verlängert Generationszeiten und damit erniedrigte Mitose - Indices wurden auch von G. CHIKKAPPA (15) ermittelt.

Neben der Veränderung der Mitose - Indices können vermeh reife Zellen in den eigenen Kulturen gefunden werden, wahrscheinlich durch verstärkte Ausreifung bedingt. Dies wird durch Untersuchungen von P. GELINSKY (21) bestätigt, der eine verkürzte Erythrozytenreifungszeit feststellte. Hier müßte man skipped division annehmen.

Auch die Vermehrung der Proerythroblasten nach 24 und 48 bestätigt Ergebnisse, die anhand von Diffusionskammerexperimenten gewonnen wurden. G. CHIKKAPPA (15) und S. ÖHL konnten eine Vermehrung erythropoetischer Vorstufen im Knochenmark und im Blut von OMS - Patienten zeigen. Sie bezeichnen diese Vermehrung als Ursache für die verstärkte Erythrozytenproduktion, die in ihren Untersuchungen gegenüber Normalpersonen erhöht ist.

Die Übereinstimmung der eigenen Ergebnisse mit in vivo und experimentellen Untersuchungen von OMS - Zellen machen deutlich, daß Faktoren, die die Zellen beeinflussen, auch im Serum von OMS - Patienten nachweisbar sind. Dies betrifft nicht nur die Erythropoese sondern auch die Granulopoese, wie die nachfolgenden Ausführungen zeigen werden.

Granulopoese: In den eigenen Untersuchungen findet sich in der Granulopoese eine deutliche Abnahme des Mitose - Index (nach 24 h signifikant), insbesondere des der Promyelozyten. G. CHIKKAPPA (15) und D. MÜLLER (43) beschreiben übereinstimmend eine Verlängerung der Generationszeit myelopoetischer Zellen bei der OMS und bestätigen damit unsere Ergebnisse.

In den Kulturen können ferner neutrophile segmentkernige Granulozyten und Promyelozyten vermehrt gesehen werden, letztere allerdings nur nach 48 und 72 h. Beides wird durch andere Untersucher bestätigt. So ermittelte T. UCHIDA (57) eine auf das 1,5fache erhöhte Produktion neutrophiler segmentkerniger Granulozyten. Ähnliche Ergebnisse berichtet S. ÖHL (47) aus Diffusionskammerexperimenten. Er errechnete ein Verhältnis von teilungsfähigen zu nicht mehr teilungsfähigen myelopoetischen Zellen von 1:4,7. Diese Zunahme ist in den eigenen Kulturen demnach auf vermehrte Reifung zurückzuführen, die hier besonders zu Lasten der neutrophilen Myelozyten erfolgt.

Die prozentuale Zunahme der Promyelozyten wird durch P.A. CHERVENICK (14), G. CHIKKAPPA (16) und J.M. GOLDMAN (22) bestätigt, die im Blut bzw. im Knochenmark von OMS - Patienten deutlich mehr myelopoetische Vorstufen fanden. Die Vermehrung der Promyelozyten in den eigenen Kulturen ist allerdings vergleichsweise gering. Eventuell üben die neutrophilen segmentkernigen Granulozyten einen hemmenden Effekt auf die Granulopoese aus, wie dies von G. CHIKKAPPA (16) beschrieben wird. Es muß auch berücksichtigt werden, daß leukokinetische Parameter stärker als erythrokinetische von Patient zu Patient variieren und so die Ergebnisse beeinflussen.

Eine häufiger in der Literatur beschriebene Eosinophilie kann in den eigenen Untersuchungen nicht gefunden werden.

Veränderungen der karyologischen Kurven oder der Zellmorphologie sind von anderen Autoren nicht beschrieben und können auch in unseren Kulturen nicht gesehen werden.

Sonstige Zellen: Ähnlich wie bei den Kulturen mit PRCA - Serumzusatz kann auch nach OMS - Serumzusatz eine prozentuale Zunahme großer Retikulumzellen festgestellt werden. Diese ist jedoch geringer ausgeprägt. Legt man bei der OMS ebenso wie bei den anderen myeloproliferativen Erkrankungen einen ursächlichen Mechanismus auf Stammzellebene zugrunde, so wäre der pathogenetische Ablauf ähnlich dem bereits bei der PRCA beschriebenen. Anders als bei der PRCA können sich Stammzellen bei der OMS noch in erythropoetische Zellen differenzieren, was die zahlenmäßigen Unterschiede erklärt.

In Bezug auf die großen Retikulumzellen stimmen die Ergebnisse qualitativ bei OMS - und PRCA - Serumzusatz überein, so daß ein pathogenetischer Zusammenhang von PRCA und OMS bzw. myeloproliferativem Syndrom zumindest denkbar erscheint.

6. Zusammenfassung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der Seren von Patienten mit "Pure Red Cell Anemia" und "Osteomyelosklerose" auf menschliche Knochenmarkkulturen über drei Tage untersucht. Vom Knochenmark vier verschiedener Spender wurden Suspensionskulturen mit 40 %igem Serumzusatz angelegt und entsprechenden Kulturen ohne Serumzusatz gegenübergestellt. Die nach 24, 48 und 72 h angefertigten Präparate wurden nach Pappenheim gefärbt und anschließend Differentialzählungen durchgeführt. Zur Beurteilung der Veränderungen wurden die Reifungskurven, der G/E - Index, die Mitose - Indices, die karyologischen Kurven und morphologische Veränderungen herangezogen. Statistische Berechnungen zeigten die Signifikanz bezüglich der zahlenmäßigen Unterschiede.

Unter PRCA - Serumzusatz zeigte die Erythropoese eine deutlich verminderte Proliferation. Der Anteil unreifer Zellen sank stark ab im Vergleich zur Kontrolle. Abweichend von anderen Untersuchern konnte ein Effekt auf die Granulopoese gezeigt werden. Es war eine Rechtsverschiebung zu erkennen und die proliferative Aktivität sank. Der Anteil der Promyelozyten stieg stärker an. Eine deutliche Zunahme großer Retikulumzellen war ebenfalls zu erkennen.

Unter OMS - Serumzusatz sank sowohl der Mitose - Index der Erythroblasten als auch der der Granuloblasten. Bezüglich der Reifungskinetik zeigten sowohl die Erythropoese als auch die Granulopoese eine Rechtsverschiebung. Auffällig war die Zunahme an Proerythroblasten nach 24 und 48 h, der Promyelozyten nach 48 und 72 h und der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten im Zeitverlauf. Auch unter OMS - Serumzusatz stieg der Anteil großer Retikulumzellen.

Die Ergebnisse wurden anhand von in der Literatur beschriebenen experimentellen Arbeiten diskutiert. Aufgrund von ähnlichen Veränderungen bezüglich der großen Retikulumzellen bei OMS - und PRCA - Serumzusatz wurde die Frage eines pathogenetischen Zusammenhangs beider Erkrankungen aufgeworfen.

7. Literaturverzeichnis

1. Al-Mondhiry, H., Zanjani, E.D., Spivack, M., Zalusky, R., Gordon, A.S.: Pure Red Cell Aplasia and Thymoma: Loss of Serum Inhibitor of Erythropoiesis Following Thymectomy. Blood Vol. 38 (1971) No. 5, 576

2. Athens, J.W., Haab, O.P., Raab, S.O., Ashenbrucker, Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M.: Leukokinetic Studies: XI. Blood Granulocyte Kinetics in Polycythemia Vera, Infection, and Myelofibrosis. Journal of Clinical Investigation Vol. 44 (1965) No. 5, 778

3. Belitz, H.J.: Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Sonderdruck aus: Der Mathematikunterricht. Heft 3/60. Ernst Klett Verlag Stuttgart 1960

4. Block, M.H.: Phylogenetic and Embryological Basis of Myeloid Metaplasia. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis-Osteosclerosis Syndrome Berlin 1974. Advances in the Biosciences Vol. 16, S.105. Vieweg 1975

5. Boll, I., Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17 (1968) Heft 4, 193

6. Boll, I., Mersch, G.: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro. Blut 19 (1969) Heft 5, 257

7. Boll, I., Correll, V.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. Blut 24 (1972), 102

8. Boll, I., Collmann, H., Aust, Ch.: Quantitative Bestimmung der Proliferationskinetik des menschlichen Knochenmarks während drei Kulturtagen. Blut 31 (1975) Heft 4, 201

9. Boll, I. et al.: Serum Factors Influencing Human Granulocytopoietic Proliferation in Clot Cultures. Experimental Hematology Vol. 7 (1979) No. 3, 121

10. Boll, I.: Die morphologische Charakterisierung des myelopoetischen Stammzellspeichers beim Menschen. Folia haematologica Leipzig 107 (1980) Heft 4, 531

11. Boll, I.: Zytologische Knochenmarkdiagnostik. Ein Leitfaden. Zweite, neubearbeitete Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1980

12. Brunner, H.E.: Die Osteomyelofibrose. Untersuchung der Ferro- und Erythrozytenkinetik mit radioaktivem Eisen und Chrom. Acta haematologica 34 (1965), 257

13. Burkhardt, R., Bartl, R., Beil, E., u.a.: Myelofibrosis-Osteosclerosis Syndrome - Review of Literature and Histomorphology. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis-Osteosclerosis Syndrome Berlin 1974. Advances in the Biosciences Vol. 16, S.9. Vieweg 1975

14. Chervenick, P.A.: Increase in Circulating Stem Cells in Patients With Myelofibrosis. Blood 41 (1973) No. 1, 67

15. Chikkappa, G., Carsten, A.L., Chanana, A.D., Chandra, P., Cronkite, E.P.: Increased Granulocytic, Erythrocytic, and Megakaryocytic Progenitors in Myelofibrosis With Myeloid Metaplasia. American Journal of Hematology Vol. 4 (1978), 121

16. Chikkappa, G., Carsten, A.L., Cronkite, E.P.: Kinetics of Proliferation and Differntiation of Human Hemopoietic Cells in a Diffusion Chamber System. Experimental Hematology Vol. 8 (1980) No. 5, 533

17. Dörmer, P.: Das erythrozytäre Zellsystem. In: Queißer, W. (Hrsg.): Das Knochenmark. S. 150. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978

18. Field, E.O., Caughi, M.N., Blackett, N.M., Smithers, D.W.: Marrow - Suppressing Factors in the Blood in Pure Red Cell Aplasia, Thymoma, and Hodgkin's Disease. British Journal of Haematology 15 (1968), 101

19. Fliedner, Th.M., Stodtmeister, R.: Experimentelle und klinische Strahlenhämatologie. J.F. Lehmanns Verlag München 1962

20. Fritsch, H.: Die Osteomyelosklerose. In: Queißer, W. (Hrsg.): Das Knochenmark. S. 351 Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978

21. Gelinsky, P., Müller, D.: Die Anämie bei Osteomyelosklerose. Vergleich zwischen hämatologischen und erythrokinetischen Untersuchungen. Klinische Wochenschrift Nr. 50 (1972), 21

22. Goldman, J.M., Seitanides, B., Ruutu, T., Th'ng, K.H.: Granulocyte-Committed Progenitor Cells in the Blood of Patients With Myelosclerosis. Scandinavian Journal of Hematology 21 (1978), 318

23. Hagberg, H., Nilsson, P., Nisee, J.: Treatment of Pure Red Cell Aplasia with Antilymphcytic Globulin. Report of Two Cases. Scandinavian Journal of Hematology 24 (1980), 360

24. Huber, H., Lewis, S.M., Szur, L.: Zur Anämie bei Osteomyelosklerose. Blut 18 (1969) Heft 5, 257

25. Hunstein, W.: Experimental Myelofibrosis. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis - Osteosclerosis Syndrome Berlin 1974. Advances in the Biosciences Vol. 16, S. 191. Vieweg 1975

26. Jedlička, V., Heřmanská, Z., Kubát, K.: Die idiopathische Myelofibrose mit terminaler Ausschwemmung retikulärer Zellen in das periphere Blut. Acta Medica Scandinavica Vol. 169 (1961) fasc. 4, 479

27. Jepson, J.H., Lowenstein, L.: Inhibition of Erythropoiesis by a Factor Present in the Plasma of Patients with Erythroblastopenia Blood 27 (1966) No. 4, 425

28. Jepson, J.H., Lowenstein, L.: Panhypoplasia of the Bone Marrow: I. Demonstration of a Plasma Factor with Anti-Erythropoietin-Like Activity. Canadian Medical Association Journal Vol. 99 (1968), 99

29. Jungi, W.F., Meuret, G., Senn, H.J.: Granulozytenclearence und Granulozytenkinetik bei myeloproliferativen Syndromen. Schweizer medizinische Wochenschrift Nr. 104 (1974), 133

30. Kesse-Elias, M., Gyftaki, E., Alevizou-Terzaki, V., Malamos, B.: ^{59}Fe and ^{51}Cr Studies in Aplastic Anemia and Myelosclerosis. Acta haematologica 39 (1968), 139

31. Kirshner, J.J., Goldberg, J., Landaw, S.A.: The Spleen as a site of Colony-Forming Cell Production in Myelofibrosis. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 165 (1980), 279

32. Krantz, S.B., Kao, V.: Studies on Red Cell Aplasia. I. Demonstration of a Plasma Inhibitor to Heme Synthesis and an Antibody to Erythroblast Nuclei. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA Vol. 58 (1967), 493

33. Krantz, S.B., Kao, V.: Studies on Red Cell Aplasia. II. Report of a Second Patient with an Antibody to Erythroblast Nuclei and a Remission after Immunosuppressive Therapy. Blood 34 (1969), 1

34. Krantz, S.B., Moore, W.H.: Red Cell Aplasia: Demonstration of Erythroblast Cytotoxity in γG-Globulin Fraction of Plasma (Abstract). Blood 38 (1971), 834

35. Krantz, S.B.: Studies on Red Cell Aplasia. III. Treatment with Horse Antihuman Thymocyte Gamma Globulin. Blood 39 (1972) No. 3, 347

36. Krantz, S.B., Moore, W.H., Zaentz, S.D.: Studies on Red Cell Aplasia. V. Presence of Erythroblast Cytotoxity in γG-Globulin Fraction of Plasma. The Journal of Clinical Investigation Vol. 52 (1973), 324

37. Krantz, S.B.: Diagnosis and Treatment of Pure Red Cell Aplasia. Medical Clinics of North America Vol. 60 (1976), 945

38. Löwenberg, B., Ghio, R.: An Assay for Serum Cytotoxity Against Erythroid Precursor Cells in Pure Red Cell Aplasia. Biomedicine 27 (1977), 285

39. Mangan, K.F., Chikkappa, G., Scharfman, W.B., Desforges, J.F.: Evidence for Reduced Erythroid Burst (BFU_E) Promoting Function of T-Lymphocytes in the Pure Red Cell Aplasia of Chronic Lymphocytic Leukemia. Experimental Hematology Vol. 9 (1981) No. 5, 489

40. Marmont, A., Peschle, C., Sanguineti, M., Condorelli, M.: Pure Red Cell Aplasia (PRCA): Response of Three Patients to Cyclophosphamide and/or Antilymphocyte Globulin (ALG) and Demonstration of Two Types of Serum IgG Inhibitors to Erythropoiesis. Blood 45 (1975) No. 2, 247

41. McDonald, G.A., Dodds, T.C., Cruickshank, B.: Atlas der Hämatologie. Dritte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1979

42. Moore, M.A.S.: Embryologic and Phylogenetic Development of the Hemopoietic System. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis-Osteosclerosis Syndrome Berlin 1974. Advances in the Biosciences Vol. 16, S. 87. Vieweg 1975

43. Müller, D.: Klinik und Pathogenese der Osteomyelosklerose. Deutsche Medizinische Wochenschrift Nr. 95 (1970), 643

44. Najean, Y., Cacchione, R., Castro-Malaspina, H., Dresch, C.: Erythrokinetic Studies in Myelofibrosis: Their Significance for Prognosis. British Journal of Haematology Vol. 40 (1978), 205

45. Neumann, E.: Versuch einer Stadieneinteilung der Osteomyelosklerose nach ferrokinetischen Befunden. Acta haematologica 56 (1976), 89

46. Nowell, P.C., Finan, J.B.: Cytogenetics of Acute and Chronic Myelofibrosis. Virchows Archiv B, Cell Pathology 29 (1978), 45

47. Öhl, S., Carsten, A.L., Chanana, A.D., Chikkappa, G., Cronkite, E.P.: Increased Erythrocytic and Neutrophilic Progenitors in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. European Journal of Cancer Vol. 12 (1976), 131

48. Queißer, W.: Die Erythroblastopenien. In: Queißer, W. (Hrsg.): Das Knochenmark, S. 372. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978

49. Romano, E., Layrisse, M., Romano, M., Soyano, A., Layrisse, Z.: Electron Microscopic Demonstration of IgG Antibodies Directed to Erythroblast in Primary Acquired Pure Red Cell Aplasia. Clinical Immunology and Immunpathology 17 (1980), 330

50. Rubinstein, M.A.: Pure Red Cell Aplasia as a Manifestation of Leukemia (Abstract). XII. Congress International of the Society of Hematology 1968, S.27

51. Safdar, S.H., Krantz, S.B., Brown, E.B.: Successful Immunosuppressive Treatment of Erythroid Aplasia Appearing after Thymectomy. British Journal of Haematology Vol. 19 (1970), 435

52. Schulz, K., Preussner, S., Konrad, H., Nowotny, P., Kienke, H.: Untersuchungen zur Erythrozytenkinetik bei Osteomyelosklerose und -fibrose. Radiobiologia,Radiotherapia 11 (1970), 129

53. Schulz, K., Nowotny, P., Bast, G., Preussner, S., Konrad, H., Kienke, H.: Vergleichende Untersuchungen zur Erythrozytenkinetik und zur Knochenmarksmorphologie bei Patienten mit Osteomyelosklerose und Osteomyelofibrose. Acta haematologica 43 (1970), 280

54. Shirashi, Y.: Philadelphia Chromosome in Pure Red Cell Aplasia. A Preleukemic State? Cancer Genetic and Cytogenetic Vol. 2 (1980) No. 1, 1

55. Trentin, J.J.: Hemopoietic Inductive Microenvironments (HIM): Implications for Myelofibrosis. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis-Osteosclerosis Syndrome Berlin 1974. Advances in the Biosciences Vol. 16, S.77. Vieweg 1975

56. Uchida, T., Kariyone, S.: Leukokinetic Studies in Peripheral Blood. III. Neutrophilic Granulocyte Kinetics in Neutrophilia, Polycythemia, Myelofibrosis and Acute Leukemia. Acta Haematologica Japonica 35 (1972), 538

57. Uchida, T., Umino, M., Yui, T., Kimura, H., Tanaka, T., Muroi, S., Matsuda, S., Kariyone, S.: Red Cell Production and Destruction in Primary Myelofibrosis with Reference to the Neutrophil and Platelet Kinetics. Acta Haematologica Japonica 44 (1981), 31

58. Vilan, J., Rhyner,K., Ganzoni, A.: Immunosuppressive Treatment of Pure Red Cell Aplasia. The Lancet 2 (1971), 51

59. Wendt, F.: Kleines Vademecum haematologicum Nordmark. Eine Einführung in die Blutzellkunde. Nordmark-Werke GmbH 1978

An dieser Stelle möchte ich Frau Professor Boll für ihre stetige und bereitwillige Unterstützung dieser Arbeit danken.

Tabellarischer Lebenslauf

Anschrift	: Norbert Paeschke Borkumer Str. 45 1000 Berlin 33 Tel.: 824 88 21
Geburtstag	: 12. April 1959
Geburtsort	: Berlin
Familienstand	: ledig (Heirat am 2.8.85) keine Kinder
Staatsangehörigkeit	: deutsch

Berufsweg

Grundschule	: April 1966 bis April 1972
Gymnasium	: Askanische Oberschule von April 1972 bis Juni 1978 1978 Teilnahme am Landeswettbewerb "Jugend forscht" Berlin (im Fach Biologie zweiter Landessieger) Ablegen des Abiturs 1978 mit der Note 1,3.
FU Berlin	: WS 1978/79 bis SS 1985 Fach: Humanmedizin Ärztliche Vorprüfung SS 1980 1. Staatsexamen SS 1981 2. Staatsexamen WS 1983/84 3. Staatsexamen SS 1985 Erteilung der Approbation am 5.7.1985